

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Sanidad Animal**



**TESIS DOCTORAL**

**Nuevos avances en el diagnóstico de enfermedades de  
mamíferos marinos**

**New advances in the diagnosis of diseases in marine mammals**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Mar Melero Asensio**

**Director**

**José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez**

**Madrid, 2018**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

Centro VISAVET



Nuevos avances en el diagnóstico de enfermedades de  
mamíferos marinos

---

New advances in the diagnosis of diseases in marine mammals

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

Dña. Mar Melero Asensio

DIRIGIDA POR EL DOCTOR

Prof. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez

MADRID, 2017







**D. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez**, Doctor en Veterinaria y Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA

Que Dña Mar Melero Asensio, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Nuevos avances en el diagnóstico de enfermedades de mamíferos marinos”, considerando que reúne los requisitos necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Madrid, a        de        de 2017

Fdo. Prof. Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez



*A mis seres queridos,  
ya que esto es sólo un capítulo de mi vida. Y vosotros,  
los que estuvisteis, los que estáis y los que vendréis,  
con lo que os quiero y lo querida que me hacéis sentir,  
vosotros hacéis que la vida merezca la pena*



# AGRADECIMIENTOS



Fuente de la imagen: [FreeImages.com/hollyereid](https://www.freemove.com/hollyereid).

En primer lugar, agradecer a mi director de tesis, **José Manuel**, quien pensó en mí para formar parte del fantástico proyecto Sanidad Marina y me ofreció ser parte de su equipo. Gracias por darme esta gran oportunidad y por creer en mí durante tantos años, primero como interna y después como doctoranda. En estos años he aprendido mucho a nivel académico, profesional y personal. De “*Presi a Presi*”, gracias de corazón.

Al ecléctico y maravilloso grupo SUAT. A **Belén**, gracias a nivel profesional y personal. Es una grandísima suerte conocerte y tenerte cerca. Para compartir alegrías, dar mil vueltas a esos *alpha* y *gamma* de verano, ver brillar esa maravillosa estrella o algo tan sencillo como el momento del “goyur”. A **Raquel**, muchas gracias por tu inestimable ayuda *project manager* veinteañera fantástica, y por ser siempre el alma de toda fiesta. A las dos, que sois el corazón de SUAT, os deseo todo lo bueno en este SUAT siempre cambiante. Ha sido un placer formar parte. A **Cris**, todo bondad y sonrisas, aunque sin piedad si hay que pegarse... eso sí, haciendo que sea divertidísimo!. A **Sandra**, siempre con ganas de aprender, ayudar y perder una mochila si es necesario!. Con las mejores tortillas de patatas en los genes y picándose tan fácil que hace que sea divertidísimo, pero siempre con todo el cariño del mundo. A **Cecilia**, espero que disfrutes mucho de esta etapa de tu vida y que tengas muchísima suerte con la beca. A las tres, que sois las caras “nuevas” de SUAT, ánimo, el camino es duro, hay que esforzarse mucho, pero merece la pena. A **Edu**, porque jamás pensé que trabajar 12 horas al día en agosto pudiera ser tan divertido, ni Nicolas Cage tan omnipresente. Ha sido un enorme placer compartir la escritura de tesis contigo y salvarnos de la locura. Ánimo, ya estás a un solo *chapter* de ser doctor. A **Joaquín**, esa cara amable que siempre me ha recibido con una gran sonrisa, como presidenta de AVAFES para pedir consejos para un curso, como doctoranda, o como Mar. A **Adolfo**, por tu nobleza, por tener siempre una sonrisa y unas palabras amables, y por ser tan Petete como yo (o más!!). A los exSUAT/siempre SUAT, de aquellos fantásticos tiempos en los que ocupábamos media cafetería al subir a comer. **Víc(tor)**, ese Tito grande y asalmonado con un corazón de oro. Gracias no sólo como SUAT sino por tantos años cerca o lejos en los que me has enseñado tanto. Admiro mucho tu forma de ser y te deseo la mejor de las suertes. A **Roci**, mil gracias por tu bondad, tu cariño, tus ánimos, tu ayuda y las muchísimas risas. A **Marina** (Silvita), se notó muchísimo tu hueco en SUAT. Por tu gran corazón, perseverancia y por lo tremendamente divertido que es tenerte cerca!. A la maravillosa y siempre sonriente **Elvira**, muchísimas gracias por tu alegría siempre contagiosa y por tu fantástica forma de ser. A **Almu**, que con tu frescura, tus refranes imposibles y tu ánimo siempre has alegrado SUAT. A **Lina**, profesional incansable que un día encabezará una lista para unas elecciones generales!. A **Debo**, por tu alegría, tus consejos y tu ayuda con el Luminex. A **Marta**, por tu alegría, tu bondad y tu optimismo sin fin. A **Ana Cristina**, mucho ánimo, felicidad y



suerte para el futuro. A **Fer**, el murciano más salao que hay!. Siempre es una gran alegría verte. A la genuina **Bea**, porque eres una gran profesional, por tus grandes lecciones de R y, sobre todo, por lo auténtica que eres. A **Facundo**, por tu honestidad y bondad. Y a aquellos con los que compartí poco tiempo, **Eliana**, una grandísima compañera de despacho!, a **Inés**, **Guo**, **Paige** y **Nico**.

A mis compañeros de Sanidad Marina. **José Luis**, siempre dispuesto, sin perder jamás la diplomacia, con tu gran corazón y siempre queriendo compartir lo que sabes, Gracias!. Y **Chel(o)**, mi compañera de máster, de viajes Madrid-Valencia, de congresos... y de momentos con muchísimas risas y también otros bajos como en un hotel en Chicago, siempre dispuesta a animar.

Al **Oceanografic**, por lo mucho que me han enseñado de estudiante de prácticas y como parte del equipo de Sanidad Marina. En especial a **Dani**, **Teresa** y **Mónica**, grandísimos profesionales siempre dispuestos a enseñar y ayudar, de vosotros he aprendido muchísimo de veterinaria, mamíferos marinos, peces y, además, he disfrutado mucho. Ha sido un gran placer coincidir con vosotros.

A **Marí(a de los) Ángeles**, una gran persona y gran profesional, que siempre has sido tan dulce y atenta conmigo.

Al maravilloso equipo del **IUSA-ULPGC**, con el que tuve la suerte de realizar la estancia de la tesis. A **Toño**, muchas gracias por abrirme de par en par las puertas del gran equipo que has formado sin dudar ni un momento, permitiéndome aprender y disfrutar muchísimo. A **Manolo**, porque con tu sonrisa perpetua, tu atención a todo el mundo y lo mucho que sabes, consigues que cualquiera se sienta bienvenido y acogido. A **Eva**, muchísimas gracias por todo. Al estar en el IUSA pude conocerte más allá de haber coincidido en algún congreso y cruzado unos emails y fue una muy grata sorpresa, tanto a nivel profesional como personal. Muchas gracias por todo el tiempo que me dedicaste en esos tres meses, aprendí muchísimo de tí. A **Josué**, uno de los primeros miembros del equipo que conocí y que siempre me asombra con sus insondables conocimientos e inquietudes, disfruta del gran futuro que sin duda te espera. A **Jesús**, por todas las risas y grandes conversaciones, y por abrirme las puertas de tu casa para disfrutar de esas divertidísimas comidas entre amigos. A **Kita**, que eres todo corazón y perseverancia, gracias por el cariño que siempre me transmites. A **Daniele**, sardo de pura cepa y con gran corazón, muchísimas gracias. A **Natalia**, que con tu fantástica forma de ser hiciste que me sintiera una más desde el primer día. A **Simona**, por tu alegría, buen corazón y lo mucho que sabes y compartes. A **Cristian**, admiro tu calma y tranquilidad, así como lo detallista que eres en el trabajo, fue un placer coincidir contigo. A **Yara**, al llegar a Canarias, conocía y admiraba tu trabajo (desde el punto de vista de los mamíferos marinos y como buceadora) pero ni si quiera te ponía cara. Me encantó conocerte. A **Óscar**, muchas gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme, enseñarme (y

regañarme si no sabía contestar a alguna de tus miles de preguntas sobre patología, jajaja) y animarme. A **Raquel**, por tu perseverancia y optimismo sin fin que son muy contagiosos. A **Yania** y **Tania**, aunque coincidimos poco, me encantó conoceros y compartir momentos con vosotras, siempre me reí mucho. A **Ani**, por tener la paciencia de enseñarme como preparar unas muestras de histología con esa gran amabilidad y cariño. A **Mercedes**, siempre en movimiento, dispuesta a ayudarme con cada papel que pude necesitar y siempre con una gran sonrisa y alegría. Y a los allegados del IUSA, Carol y Fer. **Carol**, porque aunque tú me des las gracias por ayudarte en la fase final de tu tesis, sabes que fue un grandísimo placer. No sólo porque me permitió conocerte y por lo mucho que aprendí a nivel profesional con tus casos, sino también por lo increíblemente divertido y subrealista que fue. Porque jamás pensé que pasar 15 horas en una imprenta pudiera comenzar con lágrimas y terminar con un concierto en directo, pasando por abuelas-vigilante, fotocopias *do it yourself* y aventuras para recuperar portátiles a través de ventanas. Gracias. A **Fer**, por tu gran corazón, tu nobleza y por tu amabilidad, es un gran placer conocerte.

A los grupos con los que hemos colaborado en estos años de trabajo. Al **CISA**, en especial a **Fer**, a quien conocí en 2005 entre rapaces, y hablando de AVAFES y GREFA, descubriéndome estas dos palabras que cambiarían mi futuro veterinario y personal. Gracias por todo. A **María Jesús**, siempre dispuesta a enseñar y a dar buenos consejos. Y a **Nina**, gracias. A **Luis (IOWA)**, gracias por todo. Por enseñarnos tanto de Luminex, por enseñarme mucho de escritura de un artículo y por todas tus ayudas, siempre con alegría!. A **Francisco Javier García Peña** del LCV de Algete, a **Juan Manuel Corpa** y **Joaquín Ortega** del CEU, y al equipo del **Institut Cavanilles**. Grandes colaboraciones que han mejorado los trabajos y de las que he aprendido mucho, gracias a todos.

Gracias a los **internos** a los que he cotutorizado, la mayoría durante varios años. Con vuestras preguntas y al explicaros, he aprendido mucho y he disfrutado enormemente viendo vuestras presentaciones en congresos. Gracias **Irene, Lourdes, Helena, Annys, Raquel, Diego, Carla, Jaime, Carolina, Laura M., Violeta, Álvaro, Malu, Mónica, Raquel, Carlos, Ana, Atocha, Javier, Silvia, Laura F., Ignacio, Alejandro, Taisie** y **María**.

A todo el departamento de Sanidad Animal y a VISAVET. En especial a aquellos con quien compartí trabajos como el estudio de la erisipela, **Lucas** y **Anabel Vela**. A mi compañera de despacho, la genuina **Carmen**, quien además me permitió asistirle en las prácticas. Al igual que **Toño**, de quien pude aprender mucho sobre como organizar, impartir y hacer entretenidas unas prácticas. A quien ayudó a una veterinaria a entender (lo que mi capacidad me permitía) los ordenadores, **Abby**, y a quienes consiguen que no se revelen contra nosotros, **Carlos** y **Javi**. A “los Brunos”. Y a quien asiste,

organiza, ayuda y limpia todo para que se pueda trabajar, **Reyes, Marga, Reme, Vanesa, Flora, Vicente...** Y al *Thermoteam* interdepartamental, **Luis e Iñaki**.

Y a aquellos grandes profesionales y compañeros con quienes di los primeros pasos veterinarios, como interna, voluntaria o con una cámara termográfica en las manos. De ellos y con ellos aprendí mucho de veterinaria, pero también disfruté enormemente e hicieron que amara esta profesión, fue un GRAN PLACER formar parte de vuestros equipos. En especial, recordar al maravilloso equipo de GREFA: **Fernando, Jose, Irene, Laura, Virginia, Nacho, Sara, Tenan, Ernesto, Ada, JuanPa, Juanjo, Pablo, Debora, Mariela, Paloma, Verena, Sandra, Alicia, Dani, Saray, Miguel Ángel, Kika, Manu, Lorena, Bego, Clara, Miguel, Mónica...** y tantísimos otros que son o fueron parte de GREFA. Al servicio de cirugía del HCV, especialmente a **María Suárez**, siempre amable, sonriente y única. Y a **Quirós**, con un gran corazón, que me has enseñado tanto, en un quirófano, en trauma... y con quien me he reído mucho. Al servicio de ecografía del HCV, en especial a **Natalia**, una gran profesional que me enseñó mucho del maravilloso mundo de la ecografía. Muchísimas gracias al Zoo de Madrid, especialmente, a **Eva, María, Jesús y Juncal** siempre tan profesionales, amables y atentos conmigo.

A mis amigas de la facultad y compañeras de AVAFES, **Vero, Lidia, Silvia, Noe** y muy especialmente a **Sara**, a quien conocí en nuestra primera semana de prácticas y sin quien no sería la misma persona, he aprendido muchísimo de tu maravillosa forma de ser, te quiero Charini. A **Manu**, a quien conocí guitarra en mano tocando Platero en un pueblecito de Palencia y cuya energía, bondad y alegría admiro. Y a **Carlos**, ese ya casi brasileño de gran corazón al que espera un grandísimo futuro que continúe con su gran presente.

A mis amigas de mezcla “de hortaleza, del tuto y del cole”. A cada una os he conocido en diferentes momentos, situaciones, grupos y contextos; pero hemos terminado formando, casi por casualidad, casi por destino, un grupo diverso y maravilloso: **Mara, Marta, María, Jorge, Ana, Belén, Almu, Alba e Irene**. Son muchos años y vivencias juntas, gracias por seguir ahí cada día, preocupándoos por como estoy y que me ocurre y por dejarme formar parte de vuestra vida, con sus buenos y malos días. Y a **Susi**, no podías faltar. Porque aunque hace 12 años que faltas, no faltas ni un solo día en mi vida. Y porque la amistad nunca desaparece, tus consejos, tus ganas de vivir y tu fuerza siguen en cada uno de nosotros.

A **JAME (Javi, Andrés y Esther)** porque si faltamos cualquiera, JAME ya no es JAME. Por tantos años de sentirme profunda e incondicionalmente querida, sois fundamentales en mi vida. A esos rubios geniales que alegran cada momento, **Adrián y Asier**. A **Paco, Zahara** y la pequeña

**Candela**, a **Cuco**, **Cris** y la risueña **Inés**, y a **Guille**. Me encantan todos y cada uno de los momentos que compartimos y el poder disfrutar con las maravillosas familias que estais formando.

A **Jose**, mi equipo, mi familia. Dice Milan Kundera en *La insoportable levedad del ser* “¿Pero un acontecimiento no es tanto más significativo y privilegiado cuantas más casualidades sean necesarias para producirlo? Sólo la casualidad puede aparecer ante nosotros como un mensaje. Lo que ocurre necesariamente, lo esperado, lo que se repite todos los días, es mudo. Sólo la casualidad nos habla. [...] No es la necesidad, sino la casualidad, la que está llena de encantos. Si el amor debe ser inolvidable, las casualidades deben volar hacia él desde el primer momento”. Conocerte ha estado lleno de casualidades, que se siguen sucediendo a cada paso juntos.

A mi querida familia, en conjunto y a cada uno, no puedo más que agradeceros el amor que siempre me dais, los ánimos y el saber que nunca estaré sola. A mis abuelas **María**, **Lola** y **Tina**, por ser un gran ejemplo de ilusión, bondad y fortaleza. Gracias por enseñarme que en una familia hay sitio para todos, aún siendo completamente diferentes. A mi tío **Juan**, por tu cariño, por la admiración que me produce tu arte y porque siempre me has animado a seguir estudiando. A mis tíos **Joaqui** y **Manolo**, por ejercer de padrinos, ayudándome cuando más lo he necesitado. A mis primos **Javi** y **Magda**, por todo vuestro cariño, y a vuestros maravillosos hijos, **Alejandro**, **Claudia** y **Alma**. A mis tíos **Javier** y **Pilar**, por vuestra fortaleza y porque siempre me habéis recibido con una sonrisa y animándome con mi profesión, deseando un “veterinario de cabecera”. A mi tío **Tomás**, porque compartimos pocos años juntos pero es un recuerdo que jamás quiero perder, y mi tía **Amalia** y mi primo **Antonio**, con todo mi cariño. A mi tío **Agustín**, porque siempre me hace una ilusión tremenda verte. A mi hermana **Irene**. La vida nos cambia el escenario, nos transforma profundamente a cada paso, pero, como nos decía mamá de pequeñas... “una hermana es la única persona que está a tu lado a lo largo de toda tu vida, la única compañera de todo el viaje”. A mi padre, **Jesús**, por saber de todo y siempre querer compartirlo, y por enseñarme que la familia está siempre apoyando, aún cuando no está de acuerdo. A mi madre, **Isabel**, por ser una pieza necesaria siempre en mi vida y por tu ejemplo de perseverancia y de cariño sin límite.

A quien será el gran amor de mi vida, quien ha escrito y defenderá esta tesis conmigo, quien cambiará la perspectiva, el sentido y el centro de todo.

Mi familia y amigos sois el salvavidas al que agarrarme en los peores momentos y quienes haceis grandes los buenos al celebrarlos juntos. A todos y cada uno, os quiero profundamente.



*“Ningún descubrimiento se haría ya  
si nos contentásemos con lo que sabemos”*

*Lucio Anneo Séneca (4 a.C. - 65 d.C.)*



# ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN / ABSTRACT.....	IX
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 MAMÍFEROS MARINOS.....	3
1.2 ENFERMEDADES QUE AFECTAN A LOS MAMÍFEROS MARINOS.....	4
1.2.1 <i>ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE</i> .....	12
1.2.2 HERPESVIRUS.....	14
1.2.3 POXVIRUS.....	18
1.3 ESTUDIO DE ENFERMEDADES EN MAMÍFEROS MARINOS.....	21
1.3.1 TERMOGRAFÍA.....	22
1.3.1.1 Aplicación de la termografía al estudio de la temperatura corporal.....	27
1.3.2 LUMINEX.....	29
1.3.2.1 Detección de anticuerpos frente a <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> en cetáceos.....	34
1.3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	35
1.3.3.1 Determinación de herpesvirus y poxvirus mediante PCR y análisis filogenético.....	38
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	41
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	43
2.2 OBJETIVOS.....	45
3. RESULTADOS.....	47
OBJETIVO 1: Establecer puntos y valores de referencia de la temperatura corporal mediante termografía en mamíferos marinos.....	49
RESUMEN RESULTADOS OBJETIVO 1.....	51



Thermal reference points as an index for monitoring body temperature in marine mammals.....	57
OBJETIVO 2: Estudiar la patología producida por <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> en cetáceos en libertad y mejorar las herramientas de detección de anticuerpos frente a esta bacteria.....	65
RESUMEN RESULTADOS OBJETIVO 2.....	67
First case of erysipelas in a free-ranging bottlenose dolphin ( <i>Tursiops truncatus</i> ) stranded in the Mediterranean Sea.....	71
Fluorescent microbead-based immunoassay for anti- <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> antibody detection in cetaceans.....	75
OBJETIVO 3: Analizar la presencia de diferentes virus en mamíferos marinos de cautividad y de vida libre.....	83
RESUMEN RESULTADOS OBJETIVO 3.....	85
First molecular detection and characterization of herpesvirus and poxvirus in a Pacific walrus ( <i>Odobenus rosmarus divergens</i> ) .....	93
First molecular determination of herpesvirus from two mysticete species stranded in the Mediterranean Sea.....	101
4. DISCUSIÓN.....	107
1. Establecer puntos y valores de referencia de la temperatura corporal mediante termografía en mamíferos marinos.....	109
2. Estudiar la patología producida por <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> en cetáceos en libertad y mejorar las herramientas de detección de anticuerpos frente a esta bacteria .....	112
3. Analizar la presencia de diferentes virus en mamíferos marinos de cautividad y de vida libre .....	115
3. Perspectivas y líneas de futuro.....	119
5. CONCLUSIONES.....	121
6. BIBLIOGRAFÍA.....	125
7. ANEXOS.....	175
ANEXO I: Sistemática de los mamíferos marinos.....	177
ANEXO II: Especies de mamíferos marinos clasificadas en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN en función de su riesgo relativo de extinción.....	189
ANEXO III: Otras aportaciones científicas realizadas durante esta tesis doctoral.....	193

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**Ac:** anticuerpos

**ADNc:** ADN complementario

**ELISA:** *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

**C<sub>T</sub>:** ciclo en que se supera el umbral de fluorescencia que determina que una muestra es positiva en una PCR a tiempo real.

**GAPDH:** *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)

**IgG e IgM:** inmunoglobulinas G y M

**IUCN:** *International Union for Conservation of Nature* (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza)

**PCR:** *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

**PhHV-1 y PhHV-2:** *phocine herpesvirus* 1 y 2 (herpesvirus de fócidos)

**PRRS:** *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (síndrome respiratorio y reproductor porcino)

**RT:** retrotranscripción

**SpaA:** *surface protective antigen A* (antígeno de superficie tipo A)



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Número de especies de mamíferos marinos incluidas en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN.....	4
<b>Tabla 2.</b> Publicaciones sobre enfermedades infecciosas en mamíferos marinos.....	11 (comienza en 5)
<b>Tabla 3.</b> Técnicas Luminex® desarrolladas para la detección de patógenos o anticuerpos en veterinaria.....	33 (comienza en 32)



# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Lesiones cutáneas romboidales en un delfín mular ( <i>Tursiops truncatus</i> ) causadas por <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Lesiones producidas por poxvirus en delfines listados ( <i>Stenella coeruleoalba</i> ) varados en la Comunidad Valenciana.....	20
<b>Figura 3.</b> Esquema del funcionamiento de una cámara termográfica (imagen ThermoCAM E45).....	22
<b>Figura 4.</b> Aplicaciones de la termografía al estudio de animales silvestres y de zoo.....	26
<b>Figura 5.</b> Base con imanes de la marca Bio-Plex® para el lavado manual de placas de 96 pocillos, utilizada en la tecnología Luminex®.....	29
<b>Figura 6.</b> Esquema del sistema de lectura de Luminex®.....	30
<b>Figura 7.</b> Panel de microesferas fluorescentes disponibles para los equipos Luminex 100® y Luminex 200®.....	31
<b>Figura 8.</b> Curva y recta estándar para la cuantificación en función del ciclo en que se supera el umbral de fluorescencia ( $C_T$ ).....	38
<b>Figura 9.</b> Esquema de la técnica Luminex® desarrollada para la detección de anticuerpos frente a <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> en cetáceos.....	68
<b>Figura 10.</b> Medición de la temperatura en el espiráculo durante una respiración voluntaria en una hembra de beluga ( <i>Delphinapterus leucas</i> ).....	110



# RESUMEN / ABSTRACT





Fuente de la imagen: FreeImages.com/Adi Judas.

## RESUMEN

Los mamíferos marinos son considerados buenos **centinelas de la salud de los ecosistemas marinos** por ser animales longevos; su grasa hipodérmica acumula gran cantidad de toxinas y contaminantes; algunas especies se encuentran en lo alto de la cadena trófica; muchas especies residen en zonas costeras; las actividades humanas como la pesca y el tráfico marítimo les afectan; y son susceptibles de infecciones por ciertos patógenos comunes con el ser humano y otros indicativos de desequilibrio medioambiental. Además, se trata de animales muy carismáticos que producen un gran interés social y cuya protección repercute en otras especies con las que comparten hábitat. En este contexto, el estudio de las enfermedades que les afectan es de vital importancia, siendo también urgente, ya que numerosas especies de mamíferos marinos se encuentran amenazadas.

Esta tesis doctoral, titulada “**Nuevos avances en el diagnóstico de enfermedades de mamíferos marinos**” tiene como objetivo principal aumentar el conocimiento existente sobre la sanidad de los mamíferos marinos desarrollando y aplicando herramientas de diagnóstico precoz y de estudio de agentes infecciosos. El trabajo realizado en esta tesis doctoral se recoge en cinco artículos científicos publicados en revistas de impacto internacional y en uno que se encuentra en preparación, en el que se describe la determinación sistemática de herpesvirus en los tejidos de los cetáceos varados durante tres años en las costas de la Comunidad Valenciana.

Para llevar a cabo el objetivo principal se plantearon tres objetivos concretos. El **objetivo 1** se centró en la aplicación de la termografía como herramienta para la determinación a distancia de la temperatura corporal en mamíferos marinos. Con este objetivo, se evaluaron termográficamente diferentes puntos anatómicos en dos especies de cetáceos (beluga, delfín mular) y tres de pinnípedos (león marino de la Patagonia, foca común, morsa). En los cetáceos el mejor punto de referencia termográfica de la temperatura corporal fue la mucosa del interior del espiráculo, medida durante una respiración voluntaria. En los pinnípedos el punto de elección fue el ojo, medido tras un periodo de estabilización de la temperatura después de que el animal saliese del agua, siendo este tiempo específico de cada especie. Esta técnica permite la evaluación de la temperatura de forma rápida y a

distancia, lo que aporta seguridad al técnico y no produce estrés en el animal. Estas características hacen de la termografía una herramienta especialmente útil en el estudio de la fauna silvestre.

El **objetivo 2** se centró en el estudio de la patología producida por la bacteria *Erysipelothrix rhusiopathiae* así como en la detección de anticuerpos frente a la misma en muestras de cetáceos. En primer lugar, se estudió a nivel clínico, bacteriológico e histopatológico el primer caso de septicemia en un delfín mular que varó en la costa valenciana del Mediterráneo. En segundo lugar, se desarrolló una técnica de Luminex® para la detección de anticuerpos frente a esta bacteria en tres especies de cetáceos, delfín mular, delfín listado y calderón gris. La técnica se aplicó a delfines mulares de cautividad en los que se valoró la efectividad de la vacuna, detectándose anticuerpos en todos los animales vacunados y en ninguno de los no vacunados, validando así esta herramienta con la que además puede estudiarse la variación en la cantidad de anticuerpos en función del tiempo entre revacunaciones. También se aplicó esta nueva técnica al estudio de la posible interacción con la bacteria de cetáceos de libre, incluyendo el caso clínico de erisipela estudiado en este mismo objetivo. No se determinaron anticuerpos en ninguna de las muestras de este animal, posiblemente porque la rápida evolución de la enfermedad no permitió la producción de anticuerpos específicos. Sin embargo, sí se determinaron anticuerpos específicos en el suero de un calderón gris que no presentó ningún signo de una infección por *E. rhusiopathiae* en el momento del varamiento. El resultado obtenido en el suero de este calderón mediante la técnica Luminex®, fue similar al hallado en los animales alrededor de 12 meses después de la vacunación. Esto sugiere que el animal estuvo en contacto con la bacteria varios meses antes de varar. Esta es la primera aplicación de la tecnología Luminex® a los mamíferos marinos, de gran importancia en sí misma por la gran relevancia de esta bacteria en los cetáceos pero también por ser un primer paso hacia el diseño de una técnica *multiplex*, principal ventaja de Luminex®, que permita la detección simultánea de hasta 100 analitos en una misma muestra. Esta característica es especialmente ventajosa en el caso de la fauna silvestre, donde las muestras son difíciles de conseguir y muy valiosas.

En el **objetivo 3** se planteó la necesidad de determinar la presencia de diferentes virus de interés en muestras de mamíferos marinos tanto en cautividad como en libertad. En esta

tesis doctoral se determinó por primera vez la presencia de herpesvirus y poxvirus en una morsa del Pacífico de cautividad, así como de herpesvirus en un rorcual común y en un rorcual aliblanco de vida libre, ambos varados en la Comunidad Valenciana. Por otra parte, con el objetivo de ampliar los conocimientos sobre la relación entre herpesvirus y los cetáceos, se realizó una determinación sistemática de la presencia de herpesvirus en todos los tejidos que pudieron muestrearse en los cetáceos varados en la Comunidad Valenciana durante tres años consecutivos, analizando un total de 966 muestras de cuatro especies de cetáceos (delfín listado, delfín mular, calderón gris, zifio de Cuvier). En todas las muestras positivas se determinó también la presencia de ARN con la secuencia de herpesvirus como indicativo de replicación viral, frente a la capacidad de este virus para establecer infecciones latentes durante largos periodos de tiempo. Se determinó la presencia de herpesvirus en más del 80% de los individuos y en un total de casi el 13% de los tejidos evaluados, con replicación activa en la mitad de ellos. Estos resultados, conjuntamente con características de este virus como su capacidad para producir infecciones latentes que pueden revertirse por causas como el estrés y la inmunosupresión y los pocos casos en que se ha considerado la causa de la muerte en estos animales, indican que herpesvirus es un valioso parámetro para el estudio y seguimiento de la salud de las poblaciones de mamíferos marinos. Por ello, partiendo de los resultados de este estudio, analizar a lo largo del tiempo la variación en la prevalencia de herpesvirus y en el porcentaje de tejidos en que se encuentra activo en los cetáceos varados en la Comunidad Valencia puede aportar una información muy útil en el estudio de la sanidad de estas poblaciones.

En el **conjunto de los objetivos** de esta tesis doctoral se aplica la termografía a la medición de la temperatura corporal a distancia; se desarrolla la primera aplicación de la tecnología Luminex® a los mamíferos marinos, mejorando la determinación de anticuerpos frente a *E. rhusiopathiae* y estableciendo el primer paso para un protocolo *multiplex*; se describe el primer caso de muerte por septicemia por *E. rhusiopathiae* en un delfín mular varado en el Mediterráneo valenciano; la primera determinación de herpesvirus y poxvirus en morsa del Pacífico y de herpesvirus en rorcual común y rorcual aliblanco; y el primer análisis sistemático de la presencia de ADN y ARN con la secuencia de herpesvirus en todas las muestras de cetáceos varados en un largo periodo de tiempo.

Los resultados de esta tesis doctoral describen el desarrollo y la aplicación de herramientas novedosas en el campo de la sanidad de los mamíferos marinos y supone un importante avance en el estudio de las enfermedades que les afectan. En esta tesis se han estudiado un total de 10 especies de mamíferos marinos, pero resulta útil también como primer paso en su aplicación a otras especies similares y a otras enfermedades.

## ABSTRACT

Marine mammals have long been considered good indicators of marine ecosystem health because they have long lifespans; blubber stores that can serve as depots for chemicals and toxins and some species occupy a high trophic level. In addition to this, many species reside along coasts; human activities like fishing and maritime traffic affect them, and they are vulnerable to many infectious diseases. Some of these have implications for human public health and others may serve as indicators of environmental distress syndrome. Furthermore, marine mammals are very charismatic animals, and thus provide great social interest, and their conservation has repercussions for many other species that share their environment. All of these reasons make the study of diseases of marine mammals not only very important, but also urgent, as many species of marine mammals are currently endangered.

The main objective of this doctoral thesis, entitled “**New advances in the diagnosis of diseases in marine mammals**”, is to expand the current knowledge of marine mammals’ health through the development and application of tools for early diagnosis and the study of the infectious agents. The work performed in this thesis have been included in five research articles published in scientist journals with international impact and in a draft that is currently in preparation. The latter describes the systematic determination of herpesvirus in all the sampled tissues from cetaceans stranded in the Valencian Community over a period of three years.

In order to reach this main objective, three specific objectives were established. **Objective 1** consisted of the application of thermography as a tool for the determination from distance of body temperature in marine mammals. Different anatomic points were evaluated thermographically in two cetacean species (beluga and bottlenose dolphin) and three pinnipeds (South American sea lion, harbor seal and Pacific walrus). In cetaceans, the best thermographic reference point for body temperature was the mucosa inside the blowhole, when was measured during voluntary breathing. In pinnipeds, the best thermographic reference point was the eye, when was measured after a stabilization period after the animal had left the water, which is characteristic for each species. The thermography allows rapid, remote, non-invasive measurement of body temperature, which avoids stressing

the animals and is also safe for the technicians. These characteristics made thermography a very useful tool in the evaluation of wildlife.

The 2<sup>nd</sup> **objective** focused on studying the pathology caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae* and the detection of antibodies against this bacteria in samples taken from cetaceans. The first case of septicemia for this bacteria in a bottlenose dolphin stranded in the Valencian coast of Mediterranean sea was evaluated via clinical examination, bacteriology and histopathology analysis. Moreover, a Luminex® technique was developed for antibodies against *E. rhusiopathiae* determination in three cetacean species: bottlenose dolphin, striped dolphin and Risso's dolphin. This technique was validated by using serum samples of vaccinated and non-vaccinated captive bottlenose dolphins. Antibodies were determined in all of the vaccinated dolphins but in none of non-vaccinated dolphins. Then, samples from free ranging cetaceans were evaluated in order to study the interaction between cetaceans and this bacteria, including samples from the clinic case of erysipelas septicemia described previously. Antibodies were determined in none of the samples from the clinical case, probably because the disease progressed too quickly to allow the dolphin to mount a specific antibody response. However, antibodies were determined in the serum of a Risso's dolphin which lacked any signs or lesions that might be indicative of *E. rhusiopathiae* infection. The fluorescence intensity value obtained from the serum sample of this Risso's dolphin was similar to that measured in dolphins around 12 months after vaccination. This suggested that the cetacean had previously been exposed to the bacteria, though, it seemed unlikely that the animal was experiencing the disease at the time of death. This is the first application of Luminex® technology in marine mammals, being a technique of great importance because the relevance of this bacteria in cetaceans and also because is the first step in the development of a *multiplex* technique. This is the main advantage of Luminex®; it allows the simultaneous determination of up to 100 analytes in the same sample. This characteristic is especially advantageous in wildlife applications, when samples are difficult to obtain and therefore very valuable.

**Objective 3** deals with the necessity of determining several virus in samples of captive and free-ranging marine mammals. This thesis included the first determination of herpesvirus and poxvirus in a Pacific walrus, and herpesvirus in a fin whale and a common minke whale.

To increase knowledge about the relationship between herpesviruses and cetaceans, a systematic determination of herpesvirus in all tissues sampled from cetaceans stranded in the Valencian Community over three years was performed. A total of 966 samples were collected from four different species of cetaceans (striped dolphin, bottlenose dolphin, Risso's dolphin and Cuvier's beaked whale). Since herpesvirus could be in a period of latency, for all positive samples, the determination of RNA with herpesvirus sequence was also performed, as an indicator of viral replication. Herpesvirus was determined in more than the 80% of individuals and in almost 13% of tissues evaluated, with viral replication in half of them. These results, together with herpesvirus characteristics, such as its capacity to produce latent infections, (that could be reverse because of stress or immunosuppression) and the low number of reported cases in which herpesvirus has been considered the cause of death, suggest herpesvirus as a valuable parameter for evaluation and assessment of the health of marine mammals populations. Therefore, based on the results of this study, analysis of the variation in the prevalence of herpesvirus over time and in the percentage of tissues in which it is active in cetaceans stranded in the Valencia Community can provide very useful information for the study of the health of these populations.

In the **set of objectives** of this doctoral thesis, the thermography is applied to the measurement of the body temperature at a distance; the first application of Luminex® technology to marine mammals is developed, improving the determination of antibodies against *E. rhusiopathiae* and establishing the first step for a *multiplex* protocol; the first case of death by septicemia by *E. rhusiopathiae* in a bottlenose dolphin in the Valencian Mediterranean is described; the first determination of herpesvirus and poxvirus in Pacific walrus and of herpesvirus in fin whale and common minke whale; and the first systematic analysis of the presence of DNA and RNA with herpesvirus sequence in all samples from cetacean stranded over a long period of time.

The results of this doctoral thesis describe the development and application of novel tools in marine mammal health field and represent an important advance in the study of diseases that affect them. In this thesis a total of 10 species of marine mammal have been studied, but it is also useful as a first step in its application to other similar species and other diseases.





# 1. INTRODUCCIÓN



Fuente de la imagen: [FreeImages.com/Ed Dunens](https://www.freeimages.com/photo/1144444).

## 1. MAMÍFEROS MARINOS

Los mamíferos marinos han sido señalados como buenos **centinelas de la salud de los ecosistemas marinos**. Esto se debe a diversas características de estos animales. Son longevos, lo que favorece los procesos de bioacumulación de contaminantes y toxinas. Esta acumulación de tóxicos resulta acrecentada también por los procesos de biomagnificación a lo largo de la cadena trófica, especialmente en las numerosas especies que se encuentran en lo alto de la cadena alimentaria. Además, poseen una capa gruesa de grasa hipodérmica (conocida como *blubber*) que acumula gran cantidad de compuestos lipofílicos (Storelli y Marcotrigiano, 2003; García-Álvarez *et al.*, 2014). Por otra parte, muchas especies residen en zonas cercanas a la costa, estando en muchos casos cerca de zonas habitadas, lo que incrementa el efecto sobre estos animales de las actividades humanas, como la pesca y el tráfico marítimo. Por último, es importante destacar que son susceptibles de sufrir infecciones por algunos agentes patógenos que afectan también a los seres humanos y otros que pueden indicar desequilibrio medioambiental (Reddy *et al.*, 2001; Bonde *et al.*, 2004; Bossart, 2007; Moore, 2008; Bossart, 2011).

Además, al ser animales carismáticos que producen gran interés en la población, esta se muestra más sensible en su conservación (Bossart, 2011), actuando los mamíferos marinos como **especies paraguas**. Es decir, las medidas de conservación adoptadas para la protección de estos animales tienen un efecto positivo en todas las que comparten hábitat con ellos y, especialmente, en las que se encuentran en posiciones inferiores en la cadena trófica.

La denominación mamíferos marinos engloba a diversas especies clasificadas dentro de tres órdenes taxonómicos:

- *Cetacea*: los **cetáceos**, que comprende los subórdenes *Mysticeti* (cetáceos con barbas) y *Odontoceti* (cetáceos con dientes).
- *Carnivora*: son los mamíferos marinos anfibios. A este orden pertenece la Superfamilia *Pinnipedia*, los **pinnípedos** (focas, otarios y morsa). Así como otras tres especies de mamíferos marinos: la **nutria marina** y el **gato de mar** (Familia *Mustelidae*) y el **oso polar** (Familia *Ursidae*).
- *Sirenia*: los **sirénidos**, que son herbívoros.

La protección y conservación de los mamíferos marinos es un tema relevante y urgente, ya que 31 especies aparecen como **amenazadas** en la Lista Roja de Especies Amenazadas, del total de 83 especies evaluadas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (en inglés, *International Union for Conservation of Nature*, IUCN) (Tabla 1). De las 31 especies amenazadas, 2 se encuentran en peligro crítico, 16 en peligro y 13 son vulnerables.

		Cetáceos	Carnívoros	Sirénidos	Total
EXTINTO	Extinto (EX)	0	2	1	3
	Extinto en estado silvestre (EW)	0	0	0	0
AMENAZADO	En peligro crítico (CR)	2	0	0	2
	En peligro (EN)	7	9	0	16
	Vulnerable (VU)	6	3	4	13
	Casi amenazado (NT)	5	1	0	6
	Preocupación menor (LC)	22	21	0	43
	Datos insuficientes (DD)	45	3	0	48
	Total evaluado	87	39	5	131

Tabla 1. Número de especies de mamíferos marinos incluidas en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN en función del riesgo relativo de extinción que se le atribuye [Elaboración propia. Fuente de los datos: IUCN, 2016].

## 2. ENFERMEDADES QUE AFECTAN A LOS MAMÍFEROS MARINOS

Con el objetivo de analizar la salud de los mamíferos marinos como centinelas de la salud del mar, es fundamental estudiar las enfermedades que les afectan.

Arbelo *et al.* (2013) estudiaron la causa de muerte de los cetáceos varados en las Islas Canarias entre 1999 y 2005, determinando que en el 45,7% (63/138) de los animales evaluados la muerte se debió a una enfermedad. Un estudio similar realizado por Domiciano *et al.* (2016) en Brasil entre 2007 y 2012 concluyó que este porcentaje era de 28,3% (13/46).

Aún son relativamente escasos los estudios de causas de muerte durante largos periodos de tiempo en amplias zonas geográficas. Sin embargo, son numerosas las publicaciones que describen enfermedades infecciosas y/o la presencia de diferentes agentes infecciosos en mamíferos marinos de vida libre y mantenidos en cautividad.

La mayoría de las publicaciones científicas sobre enfermedades infecciosas en mamíferos marinos datan de los últimos 25 años, centrándose principalmente en aquellas producidas por bacterias y virus (Tabla 2) y en la conocida como *lobomycosis-like disease* producida por las levaduras *Lacazia loboi*, *Paracoccidioides brasiliensis* o *P. lutzii* (Reidarson *et al.*, 2001; Reif *et al.*, 2006; Bossart, 2007; Daura-Jorge *et al.*, 2011; Esperón *et al.*, 2012; Waltzek *et al.*, 2012; De Moura *et al.*, 2014; Vilela *et al.*, 2016; Sacristán *et al.*, 2016).

CETÁCEOS		
AGENTE INFECCIOSO	ESPECIE/S EN QUE SE HA DESCRITO	PUBLICACIONES RELACIONADAS
<i>Clostridium</i> spp.	Beluga, delfín listado, delfín mular	Buck <i>et al.</i> , 1987; Buck <i>et al.</i> , 1989; Walsh <i>et al.</i> , 1994; De Guise <i>et al.</i> , 1995; Seol <i>et al.</i> , 2006; Avalos-Téllez <i>et al.</i> , 2010
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Ballena de Groenlandia, beluga	Buck <i>et al.</i> , 1989; Shotts <i>et al.</i> , 1990; Mullan, 1991
<i>Enterococcus</i> spp.	Delfín común	Page, 2010
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Ballena franca austral, beluga, calderón común, calderón gris, delfín común de hocico corto, delfín de flancos blancos del Pacífico, delfín de hocico blanco, delfín listado, delfín moteado del Atlántico, delfín mular, delfín mular IndoPacífico, marsopa común, orca	Seibold y Neal, 1956; Simpson <i>et al.</i> , 1958; Geraci <i>et al.</i> , 1966; Chastel <i>et al.</i> , 1975; Sweeney y Ridgway, 1975; Provost, 1976; Thurman <i>et al.</i> , 1983; Howard <i>et al.</i> , 1983; Buck y Spotte, 1986a; Bossart y Eimstad, 1988; Hoorens <i>et al.</i> , 1988; Calle <i>et al.</i> , 1993; Di Bella <i>et al.</i> , 1995; Kinsel <i>et al.</i> , 1997; Young <i>et al.</i> , 1997; Dunn <i>et al.</i> , 2001; Terasawa <i>et al.</i> , 2001; Boseret <i>et al.</i> , 2002; Venn-Watson <i>et al.</i> , 2008; Di Nocera <i>et al.</i> , 2009; Avalos-Téllez <i>et al.</i> , 2010; Melero <i>et al.</i> , 2011; Waltzek <i>et al.</i> , 2012; Díaz-Delgado <i>et al.</i> , 2015; Fiorito <i>et al.</i> , 2016; Melero <i>et al.</i> , 2016
<i>Nocardia</i> spp.	Beluga, cachalote pigmeo, calderón gris, calderón tropical, delfín acróbata, delfín listado, delfín mular, delfín mular del Atlántico, delfín mular del Pacífico, falsa orca, marsopa común, orca	Pier <i>et al.</i> , 1970; Jasmin <i>et al.</i> , 1972; Sweeney y Ridgway, 1975; Sweeney <i>et al.</i> , 1976; Pier <i>et al.</i> , 1981; Migaki y Jones, 1983; Williams <i>et al.</i> , 1983; Buck <i>et al.</i> , 1987; Martineau <i>et al.</i> , 1988; Buck <i>et al.</i> , 1989; Robeck <i>et al.</i> , 1994; Dalton y Robeck, 1995; Robeck <i>et al.</i> , 1995; Alegre <i>et al.</i> , 1996; Dunn <i>et al.</i> , 2001; St Leger <i>et al.</i> , 2009; Avalos-Téllez <i>et al.</i> , 2010; Arbelo <i>et al.</i> , 2013
<i>Rhodococcus equi</i>	Ballena de Groenlandia	Mullan, 1991
<i>Staphylococcus</i> spp.	Beluga, delfín de flancos blancos del Pacífico, delfín de Irrawaddy, delfín mular, marsopa común	Ketterer y Rosenfeld, 1974; Colgrove y Migaki, 1976; Howard <i>et al.</i> , 1983; Varaldo <i>et al.</i> , 1988; Buck <i>et al.</i> , 1989; Kinoshita <i>et al.</i> , 1994; Siebert <i>et al.</i> , 2002; Avalos-Téllez <i>et al.</i> , 2010; Goertz <i>et al.</i> , 2011; Yu <i>et al.</i> , 2013
<i>Streptococcus</i> spp.	Beluga, calderón común, delfín de flancos blancos del Pacífico, delfín del río Amazonas, delfín mular, marsopa común, orca	Higgings <i>et al.</i> , 1980; Howard <i>et al.</i> , 1983; Buck <i>et al.</i> , 1989; Siebert <i>et al.</i> , 1999; Jauniaux <i>et al.</i> , 2002; Evans <i>et al.</i> , 2006; Bonar <i>et al.</i> , 2007;

GRAM NEGATIVAS	<i>Aeromonas</i> spp.	Beluga, delfín de flancos blancos del Pacífico, delfín mular	Cusick y Bullock, 1973; Howard <i>et al.</i> , 1983; Martineau <i>et al.</i> , 1988; Buck <i>et al.</i> , 1989; De Guise <i>et al.</i> , 1995; Avalos-Téllez <i>et al.</i> , 2010
	<i>Brucella</i> spp.	Cachalote, calderón común, calderón tropical, delfín común de hocico corto, delfín común de hocico largo, delfín de Fitzroy, delfín de flancos blancos del Atlántico, delfín listado, delfín mular, marsopa común, marsopa de Burmeister, orca, rorcual aliblanco, rorcual tropical, zifio de Sowerby	Ewalt <i>et al.</i> , 1994; Ross <i>et al.</i> , 1994; Ross <i>et al.</i> , 1996; Foster <i>et al.</i> , 1996; Jahans <i>et al.</i> , 1997; Jepson <i>et al.</i> , 1997; Clavareau <i>et al.</i> , 1998; Miller <i>et al.</i> , 1999; Bricker <i>et al.</i> , 2000; Higgins, 2000; Cloeckaert <i>et al.</i> , 2001; Dunn <i>et al.</i> , 2001; Van Bresseem <i>et al.</i> , 2001; González <i>et al.</i> , 2002; Cloeckaert <i>et al.</i> , 2003; Ohishi <i>et al.</i> , 2003; Perrett <i>et al.</i> , 2004; Dagleish <i>et al.</i> , 2007; Dagleish <i>et al.</i> , 2008; Dawson <i>et al.</i> , 2008; Hernández-Mora <i>et al.</i> , 2008; Van Bresseem <i>et al.</i> , 2008; Venn-Watson <i>et al.</i> , 2008; Avalos-Téllez <i>et al.</i> , 2010; González-Barrientos <i>et al.</i> , 2010; Guzmán-Verri <i>et al.</i> , 2012; Alba <i>et al.</i> , 2013; Davison <i>et al.</i> , 2013; Garofolo <i>et al.</i> , 2014; Isidoro-Ayza <i>et al.</i> , 2014; Maio <i>et al.</i> , 2014; Davison <i>et al.</i> , 2015; Foster <i>et al.</i> , 2015; West <i>et al.</i> , 2015; Wu <i>et al.</i> , 2016
	<i>Citrobacter freundii</i>	Delfín común, zifio de Cuvier	Page, 2010; Fernández <i>et al.</i> , 2011
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Delfín común	Page, 2010
	<i>E. coli</i>	Beluga, marsopa común	De Guise <i>et al.</i> , 1995; Higgins, 2000; Jepson <i>et al.</i> , 2000
	<i>Helicobacter cetorum</i>	Beluga, delfín común, delfín de flancos blancos del Atlántico, delfín de flancos blancos del Pacífico, delfín mular	Harper <i>et al.</i> , 2000; Harper <i>et al.</i> , 2002a; Harper <i>et al.</i> , 2002b; Harper, 2003; Avalos-Téllez <i>et al.</i> , 2010
	<i>Moraxella</i> spp.	Ballena de Groenlandia	Mullan, 1991
	<i>Morganella morganii</i>	Beluga, delfín mular	Buck <i>et al.</i> , 1987; Buck <i>et al.</i> , 1989; Higgins, 2000
	<i>Mycobacterium</i> spp.	Beluga, delfín mular, marsopa común	Flowers, 1970; Bernadelli <i>et al.</i> , 1990; Buck y Schroeder, 1990; Dunn <i>et al.</i> , 2000; Bowenkamp <i>et al.</i> , 2001; Dunn <i>et al.</i> , 2001; Morick <i>et al.</i> , 2008; Wünschmann <i>et al.</i> , 2008; Clayton <i>et al.</i> , 2012; Waltzek <i>et al.</i> , 2012
	<i>Pasteurella</i> spp.	Delfín mular	Medway y Schryver, 1973; Sweeney, 1978; Sweeney, 1986; Dunn <i>et al.</i> , 2001; Avalos-Téllez <i>et al.</i> , 2010
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Beluga, calderón, delfín común, delfín de flancos blancos del Pacífico, delfín mular del Atlántico, orca	Diamond <i>et al.</i> , 1979; Howard <i>et al.</i> , 1983; Liong <i>et al.</i> , 1985; Martineau <i>et al.</i> , 1988; Buck <i>et al.</i> , 1989; De Guise <i>et al.</i> , 1995; Higgins, 2000; Page, 2010
	<i>Salmonella</i> spp.	Calderón, delfín mular, marsopa común, orca	Bender <i>et al.</i> , 1972; Howard <i>et al.</i> , 1983; Foster <i>et al.</i> , 1999; Higgins, 2000; Jepson <i>et al.</i> , 2000; Colegrove <i>et al.</i> , 2010



VIRUS	SIN PARED	<i>Vibrio</i> spp.	Ballena franca austral, ballena yubarta, beluga, delfín común de hocico corto, delfín de flancos blancos del Atlántico, delfín moteado del Atlántico, delfín mular del Pacífico, delfín mular del Atlántico, franciscana, rorcual aliblanco, rorcual tropical, tucuxi, zifio de True	Tangredi y Medwey, 1980; Dailey, 1985; Greco <i>et al.</i> , 1985; Schroeder <i>et al.</i> , 1985; Buck y Spotte, 1986b; Fujioka <i>et al.</i> , 1988; Martineau <i>et al.</i> , 1988; De Guise <i>et al.</i> , 1995; Higgins, 2000; Parsons y Jefferson, 2000; Dunn <i>et al.</i> , 2001; Pereira <i>et al.</i> , 2007; Avalos-Téllez <i>et al.</i> , 2010
		<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	Delfín común	Díaz-Delgado <i>et al.</i> , 2014
		<i>Mycoplasma</i> spp.	Marsopa común, zifio de Sowerby	Foster <i>et al.</i> , 2011
	ADN	Adenovirus	Ballena de Groenlandia, beluga, delfín mular, rorcual norteño	Smith y Skilling, 1979; Smith <i>et al.</i> , 1987; De Guise <i>et al.</i> , 1995; Rubio-Guerri <i>et al.</i> , 2015
		Herpesvirus	Beluga, cachalote enano, calderón gris, delfín de Dusky, delfín listado, delfín mular, marsopa común, orca, rorcual aliblanco, rorcual común, zifio de Blainville, zifio de Cuvier	Martineau <i>et al.</i> , 1988; Barr <i>et al.</i> , 1989; Kennedy <i>et al.</i> , 1992; Van Bresseem <i>et al.</i> , 1994; Lipscomb <i>et al.</i> , 1996a; Mikaelian <i>et al.</i> , 1999; Blanchard <i>et al.</i> , 2001; Manire <i>et al.</i> , 2006; Saliki <i>et al.</i> , 2006; Smolarek Benson <i>et al.</i> , 2006; Esperón <i>et al.</i> , 2008; van Elk <i>et al.</i> , 2009; Arbelo <i>et al.</i> , 2010; Maness <i>et al.</i> , 2011; Arbelo <i>et al.</i> , 2012; Hart <i>et al.</i> , 2012; Rehtanz <i>et al.</i> , 2012; Soto <i>et al.</i> , 2012; Venn-Watson <i>et al.</i> , 2012; Lecis <i>et al.</i> , 2014; Sierra <i>et al.</i> , 2014; Bellehumeur <i>et al.</i> , 2015; Melero <i>et al.</i> , 2015; Sierra <i>et al.</i> , 2015; van Beurden <i>et al.</i> , 2015; van Elk <i>et al.</i> , 2016
		Papillomavirus	Ballena azul, beluga, cachalote, delfín común de hocico corto, delfín común de hocico largo, delfín costero, delfín de Dusky, delfín de Fitzroy, delfín de flancos blancos del Atlántico, delfín mular, marsopa común, marsopa de Burmeister, narval, orca	Geraci <i>et al.</i> , 1987; Lambertsens <i>et al.</i> , 1987; De Guise <i>et al.</i> , 1994; Bossart <i>et al.</i> , 1996; Van Bresseem <i>et al.</i> , 1996; Van Bresseem <i>et al.</i> , 1999a; Kennedy-Stoskopf, 2001; Bossart <i>et al.</i> , 2005; Rehtanz <i>et al.</i> , 2006; Van Bresseem <i>et al.</i> , 2007; Rector <i>et al.</i> , 2008; Rehtanz <i>et al.</i> , 2009; Bernard <i>et al.</i> , 2010; Rehtanz <i>et al.</i> , 2010; Gottschling <i>et al.</i> , 2011
		Poxvirus	Ballena de Groenlandia, ballena franca austral, ballena yubarta, calderón común, delfín chileno, delfín costero, delfín de Commerson, delfín de dientes rugosos, delfín de flancos blancos del Atlántico, delfín común de hocico corto, delfín común de hocico largo, delfín de Dusky, delfín de Héctor, delfín de hocico blanco, delfín de Peale, delfín listado, delfín mular, delfín mular Indo-Pacífico,	Flom y Houk, 1979; Geraci <i>et al.</i> , 1979; Baker, 1992; Baker y Martin, 1992; Dover, 1992; Van Bresseem <i>et al.</i> , 1993; Van Bresseem y Van Waerebeek, 1996; Van Bresseem <i>et al.</i> , 1999; Duignan, 2000; Kennedy-Stoskopf, 2001; Bracht <i>et al.</i> , 2006; Pearce <i>et al.</i> , 2008; Van Bresseem <i>et al.</i> , 2009; Fury y Reif, 2012; Blacklaws <i>et al.</i> , 2013; Van Bresseem <i>et al.</i> , 2014a; Barnett <i>et al.</i> , 2015; Fiorito <i>et al.</i> , 2015



ARN		marsopa común, marsopa de Burmeister, orca, zifio boreal del norte	
	Calicivirus	Ballena de Groenlandia, ballena gris, cachalote, delfín mular, rorcual común, rorcual norteno	Akers <i>et al.</i> , 1974; Smith y Latham, 1978; Smith <i>et al.</i> , 1978; Smith <i>et al.</i> , 1983; Smith <i>et al.</i> , 1987; Smith y Boyt, 1990; O'Hara <i>et al.</i> , 1998; Reid <i>et al.</i> , 1999; Kennedy-Stoskopf, 2001; Reid <i>et al.</i> , 2007; Van Bresseem <i>et al.</i> , 2008
	Coronavirus	Beluga, delfín mular	Mihindukulasuriya <i>et al.</i> , 2008; Woo <i>et al.</i> , 2014
	Influenzavirus	Beluga, calderón común, marsopa de Dall, mysticetos (sin especificar especies), rorcual aliblanco	Lvov <i>et al.</i> , 1978; Hinshaw <i>et al.</i> , 1986; Kennedy-Stoskopf, 2001; Reperant <i>et al.</i> , 2009
	Morbillivirus	Ballena yubarta, cachalote, cachalote pigmeo, calderón común, calderón gris, calderón tropical, delfín acróbata, delfín común de hocico corto, delfín común del mar Negro, delfín costero, delfín de dientes rugosos, delfín de flancos blancos del Atlántico, delfín de Fraser, delfín de hocico blanco, delfín listado, delfín moteado del Atlántico, delfín mular, delfín mular del Atlántico, delfín mular Indo-Pacífico, falsa orca, marsopa común, orca, orca pigmea, rorcual aliblanco, rorcual común, zifio de Blainville, zifio de Cuvier, zifio de Longman	Kennedy <i>et al.</i> , 1988; Domingo <i>et al.</i> , 1990; McCullough <i>et al.</i> , 1991; Van Bresseem <i>et al.</i> , 1991; Di Guardo <i>et al.</i> , 1992; Domingo <i>et al.</i> , 1992; Duignan <i>et al.</i> , 1992; Visser <i>et al.</i> , 1993a; Visser <i>et al.</i> , 1993b; Blixenkrone-Moller <i>et al.</i> , 1994; Lipscomb <i>et al.</i> , 1994; Di Guardo <i>et al.</i> , 1995; Domingo <i>et al.</i> , 1995; Duignan <i>et al.</i> , 1995a; Duignan <i>et al.</i> , 1995b; Osterhaus <i>et al.</i> , 1995; Blixenkrone-Moller <i>et al.</i> , 1996; Lipscomb <i>et al.</i> , 1996b; Schulman <i>et al.</i> , 1997; Tsur <i>et al.</i> , 1997; Jauniaux <i>et al.</i> , 1998; Kennedy, 1998; Birkun <i>et al.</i> , 1999; Duignan, 1999; Van Bresseem <i>et al.</i> , 1999; Taubenberger <i>et al.</i> , 2000; Kennedy-Stoskopf, 2001; van de Bildt <i>et al.</i> , 2001; Di Guardo <i>et al.</i> , 2005; Yang <i>et al.</i> , 2006; Wohlsein <i>et al.</i> , 2007; Fernández <i>et al.</i> , 2008; Beineke <i>et al.</i> , 2009; Bossart, 2010; Keck <i>et al.</i> , 2010; Soto <i>et al.</i> , 2011a; Soto <i>et al.</i> , 2011b; Mazzariol <i>et al.</i> , 2012; Soto <i>et al.</i> , 2012; Di Guardo <i>et al.</i> , 2013; Rubio-Guerri <i>et al.</i> , 2013a; Rubio-Guerri <i>et al.</i> , 2013b; West <i>et al.</i> , 2013; Groch <i>et al.</i> , 2014; Stephens <i>et al.</i> , 2014; Van Bresseem <i>et al.</i> , 2014b; Van Elk <i>et al.</i> , 2014; West <i>et al.</i> , 2015; Centelleghé <i>et al.</i> , 2016; Di Guardo <i>et al.</i> , 2016; Jacob <i>et al.</i> , 2016; Mazzariol <i>et al.</i> , 2016, Yang <i>et al.</i> , 2016
	Parainfluenza	Delfín mular	Nollens <i>et al.</i> , 2008
	Retrovirus	Cachalote enano, cachalote pigmeo, calderón gris, delfín común de hocico corto, delfín de Commerson, delfín de dientes rugosos, delfín de flancos blancos del Pacífico, delfín mular, falsa orca, marsopa común, orca	LaMere <i>et al.</i> , 2009; Wang <i>et al.</i> , 2013
	Rhabdovirus	Beluga, delfín de hocico blanco	Osterhaus <i>et al.</i> , 1993; Kennedy-Stoskopf, 2001; Philippa <i>et al.</i> , 2004; Siegers <i>et al.</i> , 2014
	Virus del Nilo occidental	Orca	St Leger <i>et al.</i> , 2011

		PINNÍPEDOS		
		AGENTE INFECCIOSO	ESPECIE/S EN QUE SE HA DESCRITO	PUBLICACIONES RELACIONADAS
BACTERIAS	GRAM POSITIVAS	<i>Corynebacterium</i> spp.	Elefante marino del norte, foca común, foca del Baikal, león marino de California	Howard <i>et al.</i> , 1983; Bauwens <i>et al.</i> , 1987; Pascual <i>et al.</i> , 1998
		<i>Dermatophilus congolensis</i>	León marino de la Patagonia	Migaki y Jones, 1983
		<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Elefante marino del norte, foca anillada, foca capuchina, foca de Groenlandia, león marino de California, oso marino del norte	Sweeney, 1974; Howard <i>et al.</i> , 1983; Lauckner 1985; Suer y Vedros, 1988; Dunn <i>et al.</i> , 2001
		<i>Nocardia</i> spp.	Foca capuchina, foca leopardo	Sweeney <i>et al.</i> , 1976; Migaki y Jones, 1983; Dunn <i>et al.</i> , 2001; St Leger <i>et al.</i> , 2009
		<i>Rhodococcus equi</i>	Foca común	Howard <i>et al.</i> , 1983
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Elefante marino del norte, foca común, foca de Groenlandia, león marino de California	VanPelt y Dieterich, 1973; Howard <i>et al.</i> , 1983; Higgins, 2000
		<i>Streptococcus</i> spp.	Elefante marino del norte, foca común, león marino de California	Howard <i>et al.</i> , 1983; Skaar <i>et al.</i> , 1994; Dunn <i>et al.</i> , 2001
	GRAM NEGATIVAS	<i>Aeromonas</i> spp.	León marino de California, león marino de Steller	Howard <i>et al.</i> , 1983; Migaki y Jones, 1983
		<i>Brucella</i> spp.	Foca anillada, foca capuchina, foca común, foca común del Pacífico, foca de Groenlandia, foca de Weddell, foca gris, morsa del Atlántico, oso marino antártico	Ross <i>et al.</i> , 1994; Foster <i>et al.</i> , 1996; Nielsen <i>et al.</i> , 1996; Ross <i>et al.</i> , 1996; Garner <i>et al.</i> , 1997; Bricker <i>et al.</i> , 2000; Forbes <i>et al.</i> , 2000; Cloeckart <i>et al.</i> , 2001; Dunn <i>et al.</i> , 2001; Cloeckart <i>et al.</i> , 2003; Maratea <i>et al.</i> , 2003; Lambourn <i>et al.</i> , 2013
		<i>E. coli</i>	León marino de California	Howard <i>et al.</i> , 1983
		<i>Leptospira</i> spp.	Elefante marino del norte, foca común, león marino de California, oso marino del norte	Vedros <i>et al.</i> , 1971; Smith <i>et al.</i> , 1974; Smith <i>et al.</i> , 1977; Dierauf <i>et al.</i> , 1985; Gulland <i>et al.</i> , 1996; Stamper <i>et al.</i> , 1998; Stevens <i>et al.</i> , 1999; Dunn <i>et al.</i> , 2001
		<i>Mycobacterium</i> spp.	Foca capuchina, foca común, león marino australiano, león marino de California, león marino de la Patagonia, oso marino de Nueva Zelanda, oso marino australiano, oso marino subantártico, oso marino sudamericano	Ehlers, 1965; Cousins, 1987; Gutter <i>et al.</i> , 1987; Lewis, 1987; Bernadelli <i>et al.</i> , 1990; Wells <i>et al.</i> , 1990; Forshaw y Phelps, 1991; Needham, 1992; Cousins <i>et al.</i> , 1993; Thompson <i>et al.</i> , 1993; Thorel y Moutou, 1994; Bernardelli <i>et al.</i> , 1996; Hunter <i>et al.</i> , 1998; Thorel <i>et al.</i> , 1998; Bastida <i>et al.</i> , 1999; Dunn <i>et al.</i> , 2001; Moeller, 2002; Cousins, 2006; Moser <i>et al.</i> , 2008; Kiers <i>et al.</i> , 2008; Kriz <i>et al.</i> , 2011
		<i>Pasteurella</i> spp.	Elefante marino del norte, león marino de California	Kennedy-Stoskopf <i>et al.</i> , 1986; Dunn <i>et al.</i> , 2001
		<i>Pseudomonas</i> spp.	Elefante marino del norte, foca común, león marino de California, león marino de las Galápagos	Rand, 1979; Howard <i>et al.</i> , 1983

VIRUS	SIN PARED	<i>Salmonella</i> spp.	Elefante marino del norte, foca común, foca de Groenlandia, foca gris, león marino de California, morsa, oso marino del norte	Jellison y Milner, 1958; Howard <i>et al.</i> , 1983; Gilmartin <i>et al.</i> , 1979; Beckmen y Nolan, 1994; Calle <i>et al.</i> , 1995; Foster <i>et al.</i> , 1998; Thornton <i>et al.</i> , 1998; Higgins, 2000; Aschfalk <i>et al.</i> , 2002
		<i>Vibrio</i> spp.	León marino de California, león marino de la Patagonia	Buck y Spotte, 1986b; Sugita <i>et al.</i> , 1996; Dunn <i>et al.</i> , 2001; Pereira <i>et al.</i> , 2007
		<i>Mycoplasma</i> spp.	Foca común	Giebel <i>et al.</i> , 1991; Ruhnke y Madoff, 1992; Higgins, 2000
	ADN	Adenovirus	León marino de California, león marino de la Patagonia, morsa, oso marino sudafricano y australiano	Britt <i>et al.</i> , 1979; Dierauf <i>et al.</i> , 1981; Kennedy-Stoskopf, 2001; Philippa <i>et al.</i> , 2004; Goldstein <i>et al.</i> , 2011; Inoshima <i>et al.</i> , 2013; Cortés-Hinojosa <i>et al.</i> , 2015
		Herpesvirus	Elefante marino del norte, foca común, foca de Groenlandia, foca gris, foca moje de Hawái, león marino de California, morsa, oso marino sudamericano	Osterhaus <i>et al.</i> , 1985; Borst <i>et al.</i> , 1986; Kennedy-Stoskopf <i>et al.</i> , 1986; Stenvers <i>et al.</i> , 1992; Daoust <i>et al.</i> , 1994; Gulland <i>et al.</i> , 1997; Harder <i>et al.</i> , 1997; King <i>et al.</i> , 1998; Lipscomb <i>et al.</i> , 2000a; Kennedy-Stoskopf, 2001; Goldstein <i>et al.</i> , 2006a; Goldstein <i>et al.</i> , 2006b; Himworth <i>et al.</i> , 2010; Maness <i>et al.</i> , 2011; Venn-Watson <i>et al.</i> , 2012; Dagleish <i>et al.</i> , 2013; Roth <i>et al.</i> , 2013; Bodewes <i>et al.</i> , 2015a; Melero <i>et al.</i> , 2014
		Parvovirus	Foca común, foca gris	Bodewes <i>et al.</i> , 2013a; Bodewes <i>et al.</i> , 2014a
		Poxvirus	Foca común, foca de Weddell, foca gris, foca monje del Mediterráneo, foca moteada, león marino de California, león marino de la Patagonia, león marino de Steller, morsa, oso marino del norte	Wilson <i>et al.</i> , 1969; Wilson y Poglayen-Neuwall, 1971; Hadlow <i>et al.</i> , 1980; Hicks y Worthy, 1987; Osterhaus <i>et al.</i> , 1990; Stack <i>et al.</i> , 1993; Osterhaus <i>et al.</i> , 1994; Simpson <i>et al.</i> , 1994; Nettleton <i>et al.</i> , 1995; Kennedy-Stoskopf, 2001; Becher <i>et al.</i> , 2002; Müller <i>et al.</i> , 2003; Burek <i>et al.</i> , 2005; Tryland <i>et al.</i> , 2005; Bracht <i>et al.</i> , 2006; Nollens <i>et al.</i> , 2006; Toplu <i>et al.</i> , 2007; Ohno <i>et al.</i> , 2011; Melero <i>et al.</i> , 2014
	ARN	Calicivirus	Elefante marino del norte, foca monje de Hawái, león marino de California, león marino de Steller, morsa del Pacífico, oso marino del norte	Gilmartin <i>et al.</i> , 1976; Smith y Latham, 1978; Smith <i>et al.</i> , 1979; Smith <i>et al.</i> , 1980; Smith, 1987; Gage <i>et al.</i> , 1990; Smith y Boyt, 1990; Barlough <i>et al.</i> , 1998; Reid <i>et al.</i> , 1999; Van Bonn <i>et al.</i> , 2000; Kennedy-Stoskopf, 2001; Reid <i>et al.</i> , 2007
		Influenzavirus	Elefante marino del norte, foca anillada, foca capuchina, foca común, foca de Groenlandia, foca del Baikal, foca del Caspio, foca gris, león marino (sin especificar especies)	Lang <i>et al.</i> , 1981; Webster <i>et al.</i> , 1981a; Webster <i>et al.</i> , 1981b; Geraci <i>et al.</i> , 1982; Hinshaw <i>et al.</i> , 1984; De Boer <i>et al.</i> , 1990; Stuen <i>et al.</i> , 1994; Callan <i>et al.</i> , 1995; Danner <i>et al.</i> , 1998; Osterhaus <i>et al.</i> , 2000; Kennedy-Stoskopf, 2001; Nielsen <i>et al.</i> , 2001; Ohishi <i>et al.</i> , 2002; Ohishi <i>et al.</i> , 2004; Reperant <i>et al.</i> , 2009; Anthony <i>et al.</i> , 2012; Ramis <i>et al.</i> , 2012; Bodewes <i>et al.</i> , 2013b; Goldstein <i>et al.</i> , 2013; Bodewes <i>et al.</i> , 2014b;

		Karlsson <i>et al.</i> , 2014; Zohari <i>et al.</i> , 2014; Bodewes <i>et al.</i> , 2015b; Bodewes <i>et al.</i> , 2015c; Krog <i>et al.</i> , 2015; Yang <i>et al.</i> , 2015; Bodewes <i>et al.</i> , 2016
<b>Coronavirus</b>	Foca común, león marino de California	Bossart y Schwartz, 1990; Kennedy-Stoskopf, 2001
<b>Morbillivirus</b>	Foca anillada, foca cangrejera, foca capuchina, foca común, foca de Groenlandia, foca del Baikal, foca del Caspio, foca gris, foca leopardo, foca monje del Mediterráneo, león marino de Hooker, morsa, oso marino de Nueva Zelanda	Blixenkrone-Moller <i>et al.</i> , 1992; Lyons <i>et al.</i> , 1993; Visser <i>et al.</i> , 1993b; Kennedy, 1998; Osterhaus <i>et al.</i> , 1998; van de Bildt <i>et al.</i> , 1999; Duignan, 2000; Kennedy <i>et al.</i> , 2000; Lipscomb <i>et al.</i> , 2000b; van de Bildt <i>et al.</i> , 2000; Kennedy-Stoskopf, 2001; van de Bildt <i>et al.</i> , 2001; Kuiken <i>et al.</i> , 2006; Bodewes <i>et al.</i> , 2013c; Duignan <i>et al.</i> , 2014; Ludes-Wehrmeister <i>et al.</i> , 2016
<b>Retrovirus</b>	León marino de California	Kennedy-Stoskopf <i>et al.</i> , 1986; Smith y Boyt, 1990; Kennedy-Stoskopf, 2001
<b>Rhabdovirus</b>	Foca anillada, morsa	Odegard y Krogsrud, 1981; Kennedy-Stoskopf, 2001; Philippa <i>et al.</i> , 2004

**Tabla 2. Publicaciones sobre enfermedades infecciosas en mamíferos marinos.** Artículos científicos sobre la presencia, patología o respuesta inmune producida por bacterias y virus en cetáceos y pinnípedos [Elaboración propia].

El estudio de estas enfermedades presenta una gran dificultad debido a la falta de técnicas específicas, de medios, de la capacidad de estudiar un gran número de individuos de algunas especies, o por el avanzado estado de descomposición de muchos de los animales varados. Algunos estudio se basan la detección a distancia de lesiones asociadas a un agente pero sin poder realizar la identificación del mismo. Por ello, aunque son numerosas las publicaciones acerca de las enfermedades infecciosas de los mamíferos marinos, aún queda mucho por descubrir.

En esta tesis doctoral nos centramos en el estudio de tres patógenos que afectan a los mamíferos marinos: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, herpesvirus y poxvirus. Nos centramos en estos tres microorganismos por diversas razones. *E. rhusiopathiae* es una bacteria relacionada con la calidad del pescado y su manejo en animales en cautividad y frente a la que se realiza vacunación en muchos centros. Además, se trata de una zoonosis con demostrada transmisión entre cetáceos y humanos. Así mismo, la transmisión de poxvirus entre pinnípedos y humanos ha sido descrita. Por otra parte, las infecciones por herpesvirus y poxvirus raramente causan la muerte del animal, influyendo en su aparición y desarrollo el estrés y la inmunosupresión. Por ello, resultan buenos marcadores de la sanidad de estos animales en su utilización como centinelas de la salud de mar.

### 1.2.1 *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE*

*Erysipelothrix rhusiopathiae* es un bacilo pleomórfico, Gram positivo, anaerobio facultativo que no forma esporas (Brooke y Riley, 1999; Wang *et al.*, 2010). Es ubicuo y puede persistir en el medio durante largos periodos en presencia de materia orgánica (Opriessnig y Wood, 2012), incluido el medio marino (Wang *et al.*, 2010). Ha sido aislada de la superficie de peces de agua salada y dulce, moluscos, crustáceos e insectos (Seibold y Neal, 1956; Lauckner, 1985; Kinsel *et al.*, 1997; Brooke y Riley, 1999; Wang *et al.*, 2010; Opriessnig *et al.*, 2013).

*E. rhusiopathiae* produce la enfermedad erisipela en animales, también conocida como mal rojo del cerdo. Esta enfermedad afecta a gran cantidad de especies, siendo especialmente relevante en cerdos y pavos (Kinsel *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2010). En humanos, la enfermedad causada por esta bacteria recibe el nombre de erisipeloides para diferenciarla de aquella causada por estreptococos denominada erisipela (Brooke y Riley, 1999).

En humanos se han descrito tres formas de enfermedad: una única lesión cutánea (erisipeloides); la forma cutánea generalizada; y la septicémica, que puede cursar con endocarditis asociada (Wang *et al.*, 2010). Si no se trata, la forma septicémica generalmente causa la muerte en humanos (Wang *et al.*, 2010), al igual que ocurre en animales (Suer y Vedros, 1988).

Es considerada una zoonosis ocupacional cuya transmisión a los trabajadores se produce principalmente por contacto con animales contaminados, sus mordeduras, necropsias o durante el manejo de pescado, sus derivados y residuos (Hillenbrand y Rostock, 1953; Chastel *et al.*, 1975; Suer y Vedros, 1988; Robson *et al.*, 1998; Hunt *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Chastel *et al.* (1975) reportaron el primer caso de transmisión de cetáceo a humano, habiéndose descrito posteriormente el aislamiento de la bacteria a partir de heridas causadas por mamíferos marinos (Suer y Vedros, 1988; Hunt *et al.*, 2008). La enfermedad causada tras esta transmisión suele consistir en una lesión localizada con eritema y dolor e inflamación de los nódulos linfáticos (Chastel *et al.*, 1975; Robson *et al.*, 1998). Sin embargo, Hunt *et al.* (2008) reportaron el caso de una persona con septicemia con malestar prolongado

y toxemia con gran riesgo para su vida tras la manipulación de un cadáver de marsopa común (*Phocoena phocoena*).

La principal fuente de infección para los mamíferos marinos es la ingestión de pescado que no ha sido bien conservado (Geraci *et al.*, 1966; Lauckner 1985; Suer y Vedros, 1988; Higgins, 2000), siendo capaz de sobrevivir a los procesos de congelación y descongelación (Geraci *et al.*, 1966; Waltzek *et al.*, 2012) y a altas concentraciones de sal (Quinn y Markey, 2003). Por ello, la mayoría de los casos reportados se refieren a animales en cautividad (Seibold y Neal, 1956; Geraci *et al.*, 1966; Medway y Schryver, 1973; Thurman *et al.*, 1983; Buck y Spotte, 1986a; Bossart y Eimstad, 1988; Kinsel *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 2001), aunque también afecta a animales en libertad (Chastel *et al.*, 1975; Di Bella *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1997; Di Nocera *et al.*, 2009; Díaz-Delgado *et al.*, 2015). Otras fuentes de infección incluyen humanos con erisipeloides, contaminación de los puntos de preparación de la comida, colonización de heridas e insectos que puedan servir como vectores mecánicos (Wood y Shuman, 1981).

En pinnípedos, esta enfermedad es muy poco frecuente y no se considera un problema clínico (Sweeney, 1974; Lauckner 1985; Suer y Vedros, 1988; Dunn *et al.*, 2001). Por el contrario, los cetáceos son más susceptibles (Suer y Vedros, 1988; Higgins, 2000) habiéndose descrito dos formas de enfermedad, cutánea y septicémica.

Seibold y Neal (1956) describieron por primera vez la enfermedad en cetáceos, habiéndose reportado desde entonces en al menos 13 especies: ballena franca austral (*Eubalaena australis*) (Fiorito *et al.*, 2016), marsopa común (Boseret *et al.*, 2002), delfín mular (*Tursiops truncatus*) (Geraci *et al.*, 1966; Provost, 1976; Hoorens *et al.*, 1988; Terasawa *et al.*, 2001; Venn-Watson *et al.*, 2008; Díaz-Delgado *et al.*, 2015), delfín mular Indo-Pacífico (*Tursiops aduncus*), delfín moteado del Atlántico (*Stenella frontalis / plagiodon*) (Provost, 1976; Díaz-Delgado *et al.*, 2015), delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) (Di Nocera *et al.*, 2009), delfín de hocico blanco (*Lagenorhynchus albirostris*) (Buck y Spotte, 1986a), delfín de flancos blancos del Pacífico (*Lagenorhynchus obliquidens*) (Kinsel *et al.*, 1997), delfín común de hocico corto (*Delphinus delphis*) (Di Bella *et al.*, 1995), orca (*Orcinus orca*) (Bossart y Eimstad, 1988; Young *et al.*, 1997), beluga (*Delphinapterus leucas*) (Calle *et al.*, 1993; Dunn *et al.*, 2001), calderón común (*Globicephala melas*) (Chastel *et al.*, 1975), calderón gris



(*Grampus griseus*) (Seibold y Neal, 1956; Simpson *et al.*, 1958; Sweeney y Ridgway, 1975; Howard *et al.*, 1983; Thurman *et al.*, 1983).

Las lesiones de piel romboidales, características de erisipela en muchas especies, se deben a trombosis en arterias periféricas que producen infartos en dermis con desprendimiento de la epidermis (Simpson *et al.*, 1958; Sweeney y Ridgway 1975; Higgins, 2000; Wang *et al.*, 2010). En cetáceos son grises, elevadas y con bordes bien definidos y se distribuyen a lo largo de todo el cuerpo (Geraci *et al.*, 1966; Thurman *et al.*, 1983; Suer y Vedros 1988; Kinsel *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 2001; Boseret *et al.*, 2002) (Figura 1).



**Figura 1.** Lesiones cutáneas romboidales en un delfín mular (*Tursiops truncatus*) causadas por *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Lesiones de forma romboidal con bordes bien delimitados y ligera depresión, distribuidas por toda la superficie del animal [Fuente: grupo Sanidad Marina de SUAT-VISAVET y Oceanogràfic de Valencia].

La forma septicémica incluye ascitis y aumento de linfonódulos mesentérico y pulmonares (Kinsel *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 2001). El curso de la enfermedad puede ser muy rápido, pudiendo pasar un animal de ser asintomático a morir en menos de un día (Waltzek *et al.*, 2012). Los hallazgos histopatológicos pueden incluir necrosis e inflamación en varios órganos, coagulación intravascular diseminada y presencia de bacterias Gram positivas intra- y extracelulares e infiltrado inflamatorio mixto (Sweeney y Ridgway, 1975; Hoorens *et al.*, 1988; Kinsel *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 2001).

### 1.2.2 HERPESVIRUS

Los herpesvirus son virus con ADN lineal de doble cadena de entre 125 y 209 kpb y cuya replicación y la encapsidación tienen lugar en el núcleo, dando lugar a los característicos

cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares. Sus viriones miden entre 120 y 250nm y presentan una envoltura que recubre la cápside icosaédrica compuesta por 162 capsómeros, que proviene de la membrana nuclear interna de la célula (MacLachlan y Dubovi, 2011a).

La familia *Herpesviridae*, que incluye las subfamilias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*, puede infectar un amplio rango de especies de mamíferos, aves, reptiles, anfibios y bivalvos (Davison, 2010), habiéndose encontrado en todas las especies de pájaros y mamíferos en que se han estudiado (MacLachlan y Dubovi, 2011a). Los herpesvirus causan desde infecciones inaparentes a patologías fatales (Cheville, 1994). La importancia de estos virus es tal que causan, al menos, una de las enfermedades más importantes de todas las especies de animales domésticos (exceptuando la oveja) como son la rinotraqueítis infecciosa bovina, la enfermedad de Aujeszky y la enfermedad de Marek (MacLachlan y Dubovi, 2011a).

En 1985 se describió por primera vez herpesvirus en mamíferos marinos, un alphaherpesvirus que afectó a focas comunes (*Phoca vitulina*) (Osterhaus *et al.*, 1985). Hasta la fecha, todos los herpesvirus detectados en mamíferos marinos pertenecen a las subfamilias *Alpha-* o *Gammaherpesvirinae* (Venn-Watson *et al.*, 2012).

En cetáceos, herpesvirus se detectó por primera vez en lesiones de piel en beluga (Martineau *et al.*, 1988; Barr *et al.*, 1989). Posteriormente, partículas compatibles con herpesvirus fueron detectadas en marsopa común con encefalitis (Kennedy *et al.*, 1992) y con lesión en mucosa peneana (Lipscomb *et al.*, 1996a); y en lesiones de piel en delfín de Dusky (*Lagenorhynchus obscurus*) (Van Bressem *et al.*, 1994).

Miembros de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* han sido determinados asociados a diversas patologías: nefritis intersticial en zifio de Blainville (*Mesoplodon densirostris*) (Arbelo *et al.*, 2012); encefalitis no supurativa en delfín mular (Esperón *et al.*, 2008), delfín listado (Sierra *et al.*, 2014) y marsopa común (van Elk *et al.*, 2016); lesiones de piel en delfín mular (Manire *et al.*, 2006; Smolarek Benson *et al.*, 2006; Hart *et al.*, 2012) y delfín listado (Sierra *et al.*, 2014); lesión genital en beluga (Bellehumeur *et al.*, 2015); así como infecciones diseminadas con lesiones necrotizantes en delfín mular (Blanchard *et al.*, 2001), con necrosis linfoide en zifio de Cuvier (*Ziphius cavirostris*) (Arbelo *et al.*, 2010), y con depleción linfoide



grave y necrosis en delfín listado (Soto *et al.*, 2012); y han sido también determinados en sangre de delfín mular y exudado del espiráculo de orca (Maness *et al.*, 2011).

Por otra parte, virus perteneciente a la subfamilia *Gammaherpesvirinae* han sido asociados con lesiones genitales en cachalote enano (*Kogia sima*), calderón gris (Smolarek Benson *et al.*, 2006), delfín mular (Smolarek Benson *et al.*, 2006; van Elk *et al.*, 2009; Rehtanz *et al.*, 2012; Lecis *et al.*, 2014), zifio de Blainville (Saliki *et al.*, 2006; Smolarek Benson *et al.*, 2006), delfín listado (Sierra *et al.*, 2015) y marsopa común (van Elk *et al.*, 2016); en lesiones mucocutáneas en marsopa común (van Beurden *et al.*, 2015); y en lesiones de piel (Hart *et al.*, 2012) y mucosa oral (Smolarek Benson *et al.*, 2006) en delfín mular.

Los hallazgos histopatológicos más comunes en las lesiones genitales asociadas con herpesvirus de ambas subfamilias fueron áreas de hiperplasia bien delimitadas con cuerpos de inclusión intranucleares en células epiteliales. Las lesiones de piel difieren en los distintos casos descritos. Barr *et al.* (1989) describieron en beluga lesiones circulares de hasta 2 cm de diámetro, ligeramente deprimidas y con el borde y el centro más oscuros. Microscópicamente, observaron necrosis y vacuolización citoplasmática. Van Bressem *et al.* (1994) asociaron a herpesvirus lesiones puntiformes negras en la piel. Manire *et al.* (2006) describen lesiones cutáneas hiperplásicas multifocales y un gran número de pápulas negras que progresaron a erosiones superficiales de color gris. Por otra parte, Sierra *et al.* (2014) reportaron áreas ovales hiperpigmentadas. Otros hallazgos microscópicos asociadas a herpesvirus en cetáceos fueron: lesiones necrotizantes en múltiples órganos (timo, bazo, corazón, músculo esquelético, útero, glándulas adrenales), neumonía intersticial linfoplasmocitaria (Blanchard *et al.*, 2001), glomerulonefritis membranosa y nefritis intersticial linfoplasmocitaria y necrotizante (Arbelo *et al.*, 2012).

Herpesvirus ha sido determinado también en siete especies de pinnípedos, cinco de las cuales pertenecen a la familia *Phocidae* [foca común (Osterhaus *et al.*, 1985; Borst *et al.*, 1986; Gulland *et al.*, 1997; Harder *et al.*, 1997; King *et al.*, 1998; Himworth *et al.*, 2010; Maness *et al.*, 2011; Roth *et al.*, 2013; Bodewes *et al.*, 2015a), foca de Goenlandia (Daoust *et al.*, 1994), foca moje de Hawái (*Monachus schauinslandi*) (Goldstein *et al.*, 2006a), elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) (Goldstein *et al.*, 2006b) y foca gris (*Halichoerus*

*grypus*) (Bodewes *et al.*, 2015a)]. Las otras dos especies pertenecen a la familia *Otariidae* [león marino de California (*Zalophus californianus*) (Kennedy-Stoskopf *et al.*, 1986; Lipscomb *et al.*, 2000a; Maness *et al.*, 2011; Venn-Watson *et al.*, 2012) y oso marino sudamericano (*Arctocephalus australis*) (Dagleish *et al.*, 2013)].

Los hallazgos asociados son diversos. Se han descrito infecciones sistémicas fatales en neonatos (Borst *et al.*, 1986; Gulland *et al.*, 1997; Harder *et al.*, 1997), donde algunos de los síntomas fueron descarga nasal, vómitos, diarrea, anorexia, fiebre y letargia. Por otra parte, se ha reportado en varios casos la afectación de las glándulas adrenales, hepatomegalia, neumonía, y erosiones en la mucosa oral (Kennedy-Stoskopf, 2001).

Los principales hallazgos histopatológicos asociados fueron: necrosis hepática sin un patrón específico; necrosis en la corteza adrenal afectando especialmente a la zona fascicular; y neumonía intersticial con infiltrado linfoplasmocitario (Kennedy-Stoskopf, 2001).

De forma general en todas las especies, la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares se considera indicativa de infección por herpesvirus. Sin embargo, es importante tener en cuenta que se ha descrito que sólo son frecuentes en los primeros estadios de la infección (Zachary y McGavin, 2012) y raros pasados los primeros siete días postinfección (Caswell y Williams, 2007), pudiendo dificultar su visualización la rápida evolución de la necrosis celular (Zachary y McGavin, 2012).

Además de las lesiones descritas, herpesvirus puede causar inmunosupresión en cetáceos (Arbelo *et al.*, 2010) y en otras especies (Babiuk *et al.*, 1989; Hannant *et al.*, 1999; Islam *et al.*, 2002), incluyendo en humanos (Flamand *et al.*, 1995; Dagna *et al.*, 2014).

Por contra, también ha sido descrita la determinación de ADN de herpesvirus en cetáceos en ausencia de lesiones (Bellière *et al.*, 2010; van Elk *et al.*, 2016).

Es importante tener en cuenta que herpesvirus presenta la capacidad de establecer infecciones latentes, durante las que sólo expresa una pequeña cantidad de genes virales pero no se producen partículas víricas (Speck y Ganem, 2010; Penkert y Kalejta, 2011). El estrés y la inmunosupresión pueden revertir esta latencia a un estado activo con replicación (Glaser y Kiecolt-Glaser, 1994). De hecho, muchos casos de enfermedades relacionadas con

herpesvirus se asocian con la reactivación del virus latente, más que con una infección primaria (Pellet y Roizman, 2013). Por todo esto, la determinación de ADN de herpesvirus en un tejido sin lesiones que pudieran estar relacionadas, puede deberse, no sólo a que el virus pudiera no producir lesión en ese tejido, sino también a que se encuentre en periodo de latencia o que, en ese caso, la patogenia pueda requerir de una reactivación tras la latencia.

En el papel de los mamíferos marinos como centinelas de la salud del mar, puede ser de gran utilidad conocer de forma detallada y fiable la prevalencia de herpesvirus y sus variaciones, así como si se está produciendo replicación viral o si se encuentra en estado latente. Hasta la fecha, son escasos los estudios en esta línea y limitados a un pequeño número de animales. Un estudio examinó varios tejidos en delfín listado y encontró que el 62,5% (5/8) de los animales estudiados fueron positivos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, *polymerase chain reaction*, PCR) (Bellière *et al.*, 2010). Otro estudio en beluga halló anticuerpos frente a herpesvirus en 6 animales de los 13 evaluados (46,15%) mediante test de seroneutralización, y en 7 de los 12 (58,33%) analizados mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (en inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) de bloqueo (Mikaelian *et al.*, 1999).

### 1.2.3 POXVIRUS

La familia *Poxviridae* son virus grandes (220-450 nm x 140-260 nm) con genoma de ADN lineal de doble cadena de entre 130kpb (parapoxvirus) y 375 kpb (entomopoxvirus) y cuya replicación tiene lugar en el citoplasma (MacLachlan y Dubovi, 2011b).

Los poxvirus son patógenos que afectan a humanos y a numerosas especies de animales silvestres y domésticos (Baker y Murcia, 2014), causando enfermedades de gran repercusión económica en algunas zonas del mundo (MacLachlan y Dubovi, 2011b). Algunos de los poxvirus que afectan a pinnípedos pueden provocar también lesiones en humanos, principalmente en la piel (Hicks y Worthy, 1987; Clark *et al.*, 2005). Afectan tanto a vertebrados como invertebrados (MacLachlan y Dubovi, 2011b), siendo algunos específicos de especie, mientras que otros pueden infectar a un amplio rango (Haller *et al.*, 2014). Estos virus son resistentes en el medio ambiente y pueden sobrevivir varios años en costras secas o en otros materiales cargados de virus (MacLachlan y Dubovi, 2011b).

En cetáceos, poxvirus ha sido asociado con lesiones cutáneas en diversas especies: calderón común (Baker, 1992), marsopa común (Baker, 1992; Baker y Martin, 1992; Van Bresseem *et al.*, 2009), marsopa de Burmeister (*Phocoena spinipinnis*), delfín de Dusky, delfín mular (Van Bresseem y Van Waerebeek, 1996; Van Bresseem *et al.*, 2009), delfín de Héctor (*Cephalorhynchus hectori*) (Baker, 1992; Duignan, 2000) subespecies de la isla del sur (*hectori*) y de la isla del norte (*maui*) (Van Bresseem *et al.*, 2009), delfín listado (Baker, 1992; Van Bresseem *et al.*, 2009), delfín de hocico blanco (Baker, 1992), delfín de Peale (*Lagenorhynchus australis*), delfín de Commerson (*Cephalorhynchus commersonii*), delfín chileno (*Cephalorhynchus eutropia*), delfín común de hocico corto y de hocico largo (*Delphinus capensis*), delfín costero (*Sotalia guianensis*) y zifio boreal del norte (*Hyperoodon ampullatus*) (Van Bresseem *et al.*, 2009). Habiéndose confirmado la presencia del agente etiológico en estas lesiones mediante microscopía electrónica o diagnóstico molecular en 14 especies: delfín mular (Flom y Houk, 1979; Geraci *et al.*, 1979; Bracht *et al.*, 2006), delfín mular Indo-Pacífico (Bracht *et al.*, 2006; Fury y Reif, 2012), delfín de flancos blancos del Atlántico (*Lagenorhynchus acutus*) (Geraci *et al.*, 1979), delfín de Dusky (Van Bresseem *et al.*, 1993), delfín común de hocico largo (Van Bresseem y Van Waerebeek, 1996), delfín común de hocico corto (Blacklaws *et al.*, 2013; Barnett *et al.*, 2015), delfín de dientes rugosos (*Steno bredanensis*) (Bracht *et al.*, 2006), delfín listado (Bracht *et al.*, 2006; Pearce *et al.*, 2008; Blacklaws *et al.*, 2013; Barnett *et al.*, 2015), marsopa de Burmeister (Van Bresseem *et al.*, 1993), marsopa común (Pearce *et al.*, 2008; Blacklaws *et al.*, 2013; Barnett *et al.*, 2015), orca (Dover, 1992), ballena de Groenlandia (*Balaena mysticetus*) (Bracht *et al.*, 2006), ballena yubarta (*Megaptera novaeangliae*) (Van Bresseem *et al.*, 2014a) y ballena franca austral (Fiorito *et al.*, 2015).

Es denominada *tattoo skin disease* por el aspecto de las lesiones, que pueden variar desde lesiones puntiformes o en anillo, planas o ligeramente elevadas, de color gris claro que pueden tener un borde gris oscuro; a patrones puntiformes más complejos de color gris, negro o amarillentos (Geraci *et al.*, 1979; Van Bresseem y Van Waerebeek, 1996) (Figura 2). Las lesiones pueden cicatrizar y aparecer como marcas de color gris claro que pueden tener el centro y el borde oscuros (Van Bresseem *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Lesiones producidas por poxvirus en delfines listados (*Stenella coeruleoalba*) varados en la Comunidad Valenciana. Lesión en flanco derecho con ligera depresión de color gris oscuro y centro blanquecino (izquierda) y lesión plana adyacente al espiráculo (centro) en un macho subadulto varado vivo en junio de 2011. Lesión en flanco derecho plana con forma de circunferencia (se observaron otras dos lesiones muy similares en sendos flancos) (derecha) en una hembra adulta varada en viva en febrero de 2014 [Fuente: grupo Sanidad Marina de SUAT-VISAVET y Oceanográfico de Valencia].

Histológicamente, las lesiones presentan tres zonas. La zona central está bien delimitada y en ella se observa vacuolización citoplasmática marcada en las células del estrato intermedio con un evidente patrón reticular. En la zona intermedia o de transición las células del estrato intermedio contienen cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos. La epidermis del tejido adyacente a la lesión se encuentra comprimida, produciéndose un cambio en la orientación normal de las células cuyo eje longitudinal pasa a ser perpendicular a la superficie de la piel. Se produce un incremento marcado del número de células del estrato externo con compresión hacia abajo, lo que explica que las lesiones en anillo sean planas o ligeramente elevadas (Geraci *et al.*, 1979; Kennedy-Stoskopf, 2001).

*Tattoo skin disease* suele ser un proceso autolimitante (Kennedy-Stoskopf, 2001) que no genera gran mortalidad en las poblaciones de cetáceos cuando es endémica, pero que puede producir la muerte de neonatos y crías que no tengan inmunidad protectora y afectar a la dinámica poblacional (Van Bressem *et al.*, 1999). Se cree que la infección induce una inmunidad protectora (Smith *et al.*, 1983; Van Bressem y Van Waerebeek, 1996; Van Bressem *et al.*, 2006) que puede ser transmitida por vía vertical protegiendo a neonatos y crías hasta, al menos, los 6 a 9 meses de edad (Van Bressem y Van Waerebeek, 1996; Van Bressem *et al.*, 2003).

En el caso de los pinnípedos, poxvirus ha sido identificado en nueve especies, cinco de ellas de la familia *Phocidae* [foca gris (Hicks y Worthy, 1987; Osterhaus *et al.*, 1990; Stack *et al.*, 1993; Osterhaus *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 1994; Nettleton *et al.*, 1995; Nollens *et*

*al.*, 2006), foca común (Becher *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2003; Bracht *et al.*, 2006; Nollens *et al.*, 2006), foca monje del Mediterráneo (*Monachus monachus*) (Toplu *et al.*, 2007), foca moteada (*Phoca largha*) (Bracht *et al.*, 2006; Ohno *et al.*, 2011) y foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) (Tryland *et al.*, 2005)], y cuatro especies pertenecientes a la familia *Otariidae* [león marino de California (Wilson *et al.*, 1969; Nollens *et al.*, 2006), león marino de Steller (*Eumetopias jubatus*) (Burek *et al.*, 2005; Bracht *et al.*, 2006), león marino de la Patagonia (*Otaria flavescens*, antes *Otaria byronia*) (Wilson y Poglayen-Neuwall, 1971) y oso marino del norte (*Callorhinus ursinus*) (Hadlow *et al.*, 1980)].

Las lesiones asociadas a poxvirus en pinnípedos fueron nódulos elevados en piel ulcerativos o no y tras cuya resolución en algunos casos permanecieron cicatrices y áreas de alopecia (Wilson *et al.*, 1969; Wilson y Poglayen-Neuwall, 1971; Hicks y Worthy, 1987; Simpson *et al.*, 1994; Nettleton *et al.*, 1995; Kennedy-Stoskopf, 2001; Becher *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2003).

Microscópicamente estas lesiones se caracterizaron por presentar hiperqueratosis y paraqueratosis en el estrato córneo y vacuolización citoplasmática y degeneración nuclear principalmente en el estrato espinoso. En las células de la epidermis se encontraron cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinófilicos. En algunos casos se describió ulceración, infiltración inflamatoria y presencia de bacterias. En la dermis se observó un infiltrado inflamatorio mixto asociado a la lesión (Kennedy-Stoskopf, 2001).

El estudio de la incidencia y distribución de poxvirus en poblaciones de mamíferos marinos puede ser un buen indicador de su salud. Se ha asociado el estrés y la debilidad con la aparición de lesiones (Kennedy-Stoskopf, 2001), y su visualización se ha descrito como un buen parámetro para determinar el estado de salud y de estrés en poblaciones de vida libre y en cautividad (Geraci *et al.*, 1979; Van Bressem *et al.*, 2009). Por extensión, resulta un buen parámetro en la evaluación de la salud de los ecosistemas marinos.

### 1.3 ESTUDIO DE ENFERMEDADES EN MAMÍFEROS MARINOS

La evaluación de estas enfermedades necesita la aplicación de diversas técnicas diagnósticas que se complementen y permitan valorarlas de forma global. Ya que todas las



metodologías presentan ventajas y limitaciones, que pueden variar dependiendo de si el objeto de aplicación son animales en libertad o en cautividad.

En esta tesis doctoral nos hemos centrado en tres técnicas:

- **Termografía** como herramienta de estudio de la temperatura corporal.
- **Luminex®** en la determinación de anticuerpos frente a *Erysipelothrix rhusiopathiae*.
- **Diagnóstico molecular** para el diagnóstico y análisis filogenético de herpesvirus y poxvirus.

### 1.3.1 TERMOGRAFÍA

En el estudio de la fauna silvestre, tanto en libertad como en cautividad, con la que el contacto directo es peligroso o difícil, es especialmente ventajosa la aplicación de técnicas que puedan realizarse a gran distancia.

Este es el caso de la termografía, una técnica no invasiva que mide las radiaciones infrarrojas de longitud de onda entre 0.8 y 1.0 mm, emitidas y reflejadas por los diferentes cuerpos y materiales y las transforma en imágenes digitales (Jones, 1998) (Figura 3) utilizando la ecuación de Stefan-Boltzmann (Speakman y Ward, 1998). Se trata de una tecnología basada en la recepción y que no emite ningún tipo de energía que pueda resultar perjudicial (Ng y Kee, 2008; Sargent, 2008; Ng y Acharya, 2009; Ring, 2010; Sivanandam *et al.*, 2012; Vreugdenburg *et al.*, 2013; Venkataramani *et al.*, 2015) por lo que su aplicación a personas y animales es totalmente segura.



**Figura 3. Esquema del funcionamiento de una cámara termográfica** (imagen ThermaCAM E45). La termografía se basa en la recepción y cuantificación de las radiaciones infrarrojas emitidas (representadas en naranja) y reflejadas (rojo) por los diferentes cuerpos y materiales [en la imagen, delfín mular, (*Tursiops truncatus*)] y su transformación en imágenes digitales (imagen de la derecha) [Elaboración propia. Fuente imagen cámara: FLIR Systems].

Las radiaciones infrarrojas, invisibles al ojo humano, fueron descritas por primera vez en 1800 por William Herschel (1738-1822) (Ring, 2016), músico y astrónomo germano-británico que descubrió también el planeta Urano. El descubrimiento de las radiaciones infrarrojas tuvo lugar mientras estudiaba el poder calórico de los distintos haces de luz derivados del paso de la luz solar a través de un prisma. Así, descubrió que todos los colores producían un aumento de temperatura en comparación con un área en el que no incidía la luz solar, siendo mayor este aumento desde el área violeta al rojo. El valor máximo se alcanzaba en el área contigua a la región del rojo, sin luz visible. Denominó rayos calóricos a los que incidían sobre esta zona, siendo conocidos actualmente como infrarrojos.

En 1840, su hijo, John Herschel plasmó por primera vez en una imagen el efecto de estos rayos al evaporar una mezcla de carbón y alcohol, a la que denominó termograma (Ring, 2000), término que sigue empleándose en la actualidad.

Las radiaciones infrarrojas son emitidas por todos los cuerpos con una temperatura superior a 0 K (273,15 °C) y presentan la misma forma de transmisión, reflexión y refracción que la luz visible. Hardy (1934) descubrió que la superficie de la piel humana presenta una eficiencia de radiación de calor muy alta similar a un cuerpo negro perfecto, aquel en el que la emisividad es 1,00 a todas las longitudes de onda porque toda la energía infrarroja que desprende es emitida por él mismo y no reflejada (Speakman y Ward, 1998). El valor de emisividad en el material biológico se considera de entre 0,95 y 0,98 (Speakman y Ward, 1998), teniendo un valor de 0,96 en los mamíferos marinos (Cuyler *et al.*, 1992), el mismo que el del agua (Campbell y Norman, 1998). Esto se debe a la fina capa de agua, lágrimas y secreción normal que recubren, respectivamente, el cuerpo, los ojos y la mucosa respiratoria de estos animales.

Numerosos estudios desarrollados durante los últimos 50 años han demostrado que la termografía infrarroja es de gran utilidad como herramienta complementaria en el diagnóstico médico (Amalu *et al.*, 2006; Hildebrandt *et al.*, 2010). Para su correcta interpretación es necesario tener en cuenta la termorregulación, anatomía, fisiología, morfología y procesos patológicos y fisiológicos que puedan afectar al objeto de estudio (Hildebrandt *et al.*, 2010).



La primera aplicación de la termografía a las ciencias médicas tuvo lugar en 1960 (Ring, 2010). Desde entonces, son numerosas sus utilidades en este campo, entre las que cabe destacar aquellas en el estudio de **alteraciones vasculares** (Hosaki *et al.*, 2002; Ammer, 2006; Bagavathiappan *et al.*, 2009; Ring, 2010; Lim *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015; Hardwicke y Titley, 2016), **cáncer de mama** (Gautherie y Gros, 1980; Head y Elliot, 1997; Keyserlingk *et al.*, 1998; Amalu *et al.*, 2006; Ng y Kee, 2008; Ng, 2009; Aweda *et al.*, 2010; Kosus *et al.*, 2010; Wishart *et al.*, 2010; Rassiwalla *et al.*, 2014), **dermatología** (Carlo, 1995; Gratt y Anbar, 1998; Burmeister *et al.*, 2016), **oftalmología** (Morgan *et al.*, 1993; Zelichowska *et al.*, 2005; Mencucci *et al.*, 2015), **neuropatía diabética** (Fushimi *et al.*, 1985; Benbow *et al.*, 1994; Armstrong *et al.*, 1997; Bharara *et al.*, 2006; Lavery *et al.*, 2007; Bagavathiappan *et al.*, 2010; Balbinot *et al.*, 2012; Bharara *et al.*, 2012), lesiones medulares y otros **desórdenes neurológicos** (Ishigaki *et al.*, 1989), **afectaciones musculares** (Park *et al.*, 2007; Baldini *et al.*, 2015), **reumatología** (Cosh y Ring, 1970; Will *et al.*, 1992; Cherkas *et al.*, 2003), **cardiología** (Kaczmarek *et al.*, 1999; Manginas *et al.*, 2010; Crozier *et al.*, 2015), **isquemia intestinal** (Moss *et al.*, 1981; Brooks *et al.*, 2000) y patologías del aparato **reproductor** (Birnbbaum y Kliot, 1964; Gershon-Cohen *et al.*, 1965; Loriaux, 1975; Lai *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2009).

Igualmente, la termografía puede ser aplicada a la veterinaria, ya que permite medir la temperatura superficial de un animal y detectar variaciones de la misma. Para ello, en primer lugar es indispensable estudiar el patrón térmico normal de la especie que se desea evaluar, aún sin definir para la mayoría de las especies de fauna silvestre. Además, es necesario conocer las variaciones que puedan existir en función de la edad, el sexo, o por los diferentes procesos fisiológicos que puedan estar sucediendo, como el celo o la gestación. Una vez establecido el patrón térmico fisiológico, el estudio de sus alteraciones y de la simetría térmica permite detectar y evaluar aquellos procesos y patologías que produzcan su modificación general o localizada.

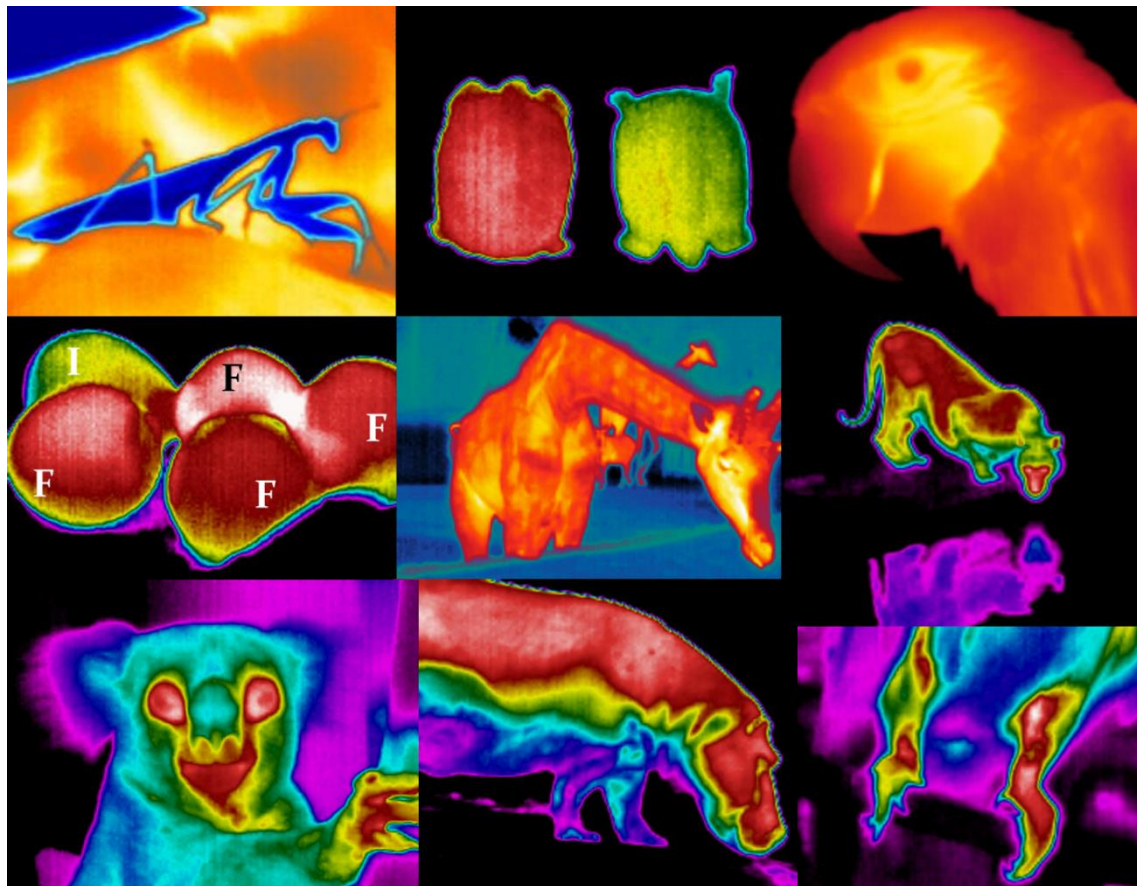
Como estableció Mabuchi *et al.* (1998) la simetría y el patrón térmico son parámetros más importantes que la temperatura absoluta en el diagnóstico clínico en humanos, habiendo llegado Melero *et al.* (2013) a la misma conclusión al estudiar los efectos de la electrocución en aves rapaces. Este principio de la simetría térmica se corresponde con las observaciones de

Uematsu (1986), Morgan *et al.* (1993) y Jones (1998) que establecieron pequeñas diferencias entre estructuras bilaterales o ambos lados de una estructura anatómica única en individuos sanos. La diferencia de temperatura más amplia que encontraron fue de 0,62 °C entre ambos ojos de personas sin patologías oculares (Morgan *et al.*, 1993).

En la interpretación de las alteraciones del patrón térmico hay que tener en cuenta que pueden tener diversas causas, tanto fisiológicas como patológicas, entre las que cabe destacar un proceso traumático, inflamatorio, infeccioso, neoplásico o de afectación neurológica, así como un aumento en la emisión de calor desde un órgano interno (Walsh y Gaynor, 2001). Por ejemplo, la afectación de un nervio que produzca una menor inervación en un músculo, reducirá su tono, disminuyendo así la temperatura del músculo y, por lo tanto, la temperatura superficial en esa zona, medible mediante termografía. Una herida varía el flujo de sangre pudiendo afectar también a la temperatura de la piel, la inflamación produce hipertermia, y una falta de perfusión reduce la temperatura de la zona (Garagiola y Giani, 1990). Por otra parte, es importante considerar el efecto que pueda tener en el patrón térmico un ente externo (por ejemplo, una lámpara de infrarrojos, un radiador u otro individuo), las condiciones ambientales y las radiaciones solares.

La termografía se ha utilizado en el estudio de procesos fisiológicos y patológicos de animales **domésticos** (Yanmaz *et al.*, 2007; McCafferty *et al.*, 2011; Pérez de Diego *et al.*, 2013), de **laboratorio** (Malafaia *et al.*, 2008) y **silvestres** (Hilsberg-Merz, 2007; Melero y Sánchez-Vizcaíno, 2010; Melero *et al.*, 2013), incluyendo los mamíferos marinos (Cuyler *et al.*, 1992; Walsh y Gaynor, 2001; Barbieri *et al.*, 2010). Dentro de los procesos fisiológicos estudiados cabe destacar el **celo** (Melero *et al.*, 2009b), la **gestación** (Hilsberg-Merz, 2007; Melero *et al.*, 2009b), la **termorregulación** (Mauck *et al.*, 2003; Hilsberg-Merz, 2007; Rodríguez-Prieto *et al.*, 2013) y la valoración de la **fertilidad** de los huevos (Melero *et al.*, 2009a; Mortola *et al.*, 2015). Por otra parte, la termografía se ha empleado en el estudio de diferentes patologías como la detección de fiebre en ovejas infectadas con el virus de la lengua azul (Pérez de Diego *et al.*, 2013) y la detección y seguimiento de la electrocución en aves rapaces (Melero *et al.*, 2013).

Esta técnica no invasiva resulta especialmente útil en estudios de fauna silvestre en libertad y de animales de zoo (McCafferty, 2007; Melero y Sánchez-Vizcaíno, 2010; Melero *et al.*, 2013), ya que una de sus principales ventajas radica en que puede utilizarse a una distancia de hasta 1.000 metros (McCafferty, 2007) lo que aporta seguridad al técnico y elimina el estrés que la manipulación puede causar en el animal (Figura 4).



**Figura 4. Aplicaciones de la termografía al estudio de animales silvestres y de zoo.** De izquierda a derecha y de arriba abajo: mantis religiosa (*Mantis religiosa*); tortugas moras (*Testudo graeca*) de las cuales el ejemplar de la izquierda, con hipertermia, falleció al día siguiente; guacamayo azulamarillo (*Ara ararauna*); huevos de cernícalo primilla (*Falco naumanni*) en el nido, siendo cuatro de ellos fértiles (F) y uno infértil (I), hecho constatado posteriormente mediante el uso de un ovoscopio; jirafa de Rothschild (*Giraffa camelopardalis rothschildi*); leona (*Panthera leo*) junto a un foso con agua, que refleja su imagen; koala (*Phascolarctos cinereus*); hipopótamo (*Hippopotamus amphibius*) tras un baño de barro, pudiéndose apreciar la diferencia de temperatura entre la mitad inferior del cuerpo que había sido sumergida y enfriada y la superior que había quedado fuera del barro; extremidades inferiores de un guacamayo azulamarillo con fractura en tarsometatarso izquierdo en fase de osificación con formación de callo óseo. Las imágenes presentan diferentes rangos de temperatura adaptados a cada una de ellas, así como diferentes paletas de colores [Imágenes propias].

### 1.3.1.1 Aplicación de la termografía al estudio de la temperatura corporal

La temperatura corporal ha sido considerada históricamente como un buen indicador de la salud (Wunderlich y Woodman, 1871; Houdas y Ring, 1982; Ring, 2007). Su estudio es esencial, ya que pequeñas variaciones de la misma pueden ser indicativo de infección (Johnson *et al.*, 2011), disfunción (Jones, 1998) o procesos fisiológicos como son el estro y la proximidad del parto (Katsumata, 2010).

El primer método de medición de la temperatura corporal se atribuye a Hipócrates (460?-377? a.C.) (Ebstein, 1928). Éste consistía en extender sobre el tórax del paciente una fina capa de un ungüento caliente preparado a base de lino triturado y tierra eritrea para poder identificar el área más caliente, que sería aquel en el que antes se secase la mezcla. Hipócrates utilizaba esta técnica para distinguir el lugar en que debía realizarse la incisión o la cauterización en casos de efusiones pleurales (Potter, 1988). Con este método no se obtenía un valor absoluto de temperatura ni se estimaba la temperatura interna. Sin embargo, sí ofrecía una imagen de la distribución de la temperatura en una zona (el patrón térmico), muy similar a la termografía infrarroja, como reprodujeron en un estudio que comparó ambos métodos (Otsuka y Togawa, 1997).

En lo que respecta a los mamíferos marinos, resulta especialmente importante el estudio de la temperatura corporal. Se trata de animales que viven completa o parcialmente en medio acuático, donde la temperatura se conduce 25 veces más rápido que en el aire (Nadel, 1984; Dejours, 1987), por lo que la termorregulación supone un gran desafío. Los pinnípedos además necesitan mecanismos que les permitan termorregular correctamente en ambos medios para mantener su temperatura corporal en el rango adecuado.

La medición de la temperatura corporal de forma directa se realiza postmortem (Morrison, 1962) o mediante la ingesta de píldoras con sensores que emiten señal a dispositivos externos (Whittow *et al.*, 1974) que presentan notables desventajas ya que resultan costosas, requieren que el animal las ingiera sin romperlas, la ingesta de alimentos altera las mediciones, pueden ser vomitadas y el lector tiene que encontrarse muy próximo al animal. Por ello, generalmente se opta por la estimación de la temperatura corporal midiendo otra temperatura, principalmente la rectal (Geraci y Lounsbury, 1993; Walsh y Gaynor,

2001; Katsumata, 2010), ya que ambas temperaturas están estrechamente correlacionadas (Michaud, 1996; Greer *et al.*, 2007). Sin embargo, procesos fisiológicos como son la digestión, el peristaltismo, la presencia de heces, el nivel del tono muscular y la actividad física pueden alterar los valores de esta temperatura (Rexroat *et al.*, 1999).

La medición de la temperatura rectal en mamíferos marinos presenta inconvenientes añadidos, como la necesidad de utilizar sondas especiales; de entrenamiento previo, sedación o anestesia; el estrés que produce en el animal; y el tiempo requerido para la medición. Además, si la sonda no profundiza lo suficiente, puede medirse una temperatura notablemente inferior por la presencia de sistemas vasculares de contracorriente encargados de enfriar los testículos (situados a ambos lados del recto) y el útero (Rommel *et al.*, 1992; Rommel *et al.*, 1993; Rommel *et al.*, 1994; Pabst *et al.*, 1995). Estas dificultades impiden su aplicación a recién nacidos, individuos sin entrenamiento y en libertad. También en animales domésticos esta técnica presenta problemas, ya que algunos individuos no lo toleran (Johnson *et al.*, 2011), como en el estudio realizado por Sousa *et al.* (2011), donde sólo el 68,2% de los perros evaluados toleraron bien la toma de temperatura rectal.

Por todo ello, es fundamental la aplicación de la termografía al estudio de la temperatura corporal.

Diversos estudios han mostrado que la temperatura corporal y la temperatura ocular, medida esta última mediante termografía, son prácticamente idénticas o están correlacionadas, como en humanos (Ng y Kaw, 2006; Purslow y Wolffsohn, 2007), ponis (Johnson *et al.*, 2011) y venados bura (Dunbar *et al.*, 2009).

Al ser una técnica no invasiva y que puede realizarse a gran distancia es especialmente interesante en animales en los que el contacto puede suponer un gran estrés para el animal y representar un peligro para el operario. Además, la termografía permite inspeccionar un gran número de individuos en un periodo corto de tiempo y a bajo coste, así como realizar muestreos dirigidos, lo que la convierte en una gran herramienta para la vigilancia sanitaria y la detección temprana, como en su aplicación a la detección de personas con fiebre (Chan *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2004; Bitar *et al.*, 2009; Ng y Acharya, 2009).

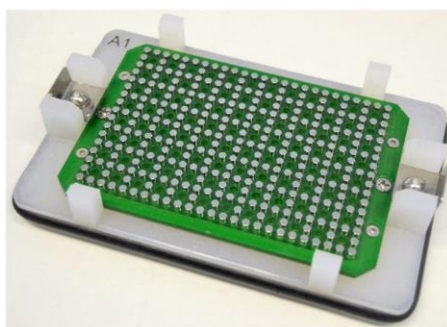


Sin embargo, en los mamíferos marinos, como en la mayoría de las especies animales, no se han definido los posibles puntos de referencia termográfica de la temperatura corporal, sus valores normales, ni su relación con la temperatura general.

### 1.3.2 LUMINEX

La tecnología Luminex® permite realizar inmunoensayos sobre la superficie de microesferas fluorescentes y su posterior lectura mediante dos láseres, pudiendo realizar hasta 100 determinaciones en un único pocillo lo que reduce enormemente el volumen de muestra necesario, así como el tiempo y el coste de las determinaciones. Además, numerosos autores han encontrado esta técnica más sensible que los inmunoensayos tradicionales (van Gageldonk *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2011; Baker *et al.*, 2012; Giménez-Lirola *et al.*, 2012; Sánchez-Matamoros *et al.*, 2015).

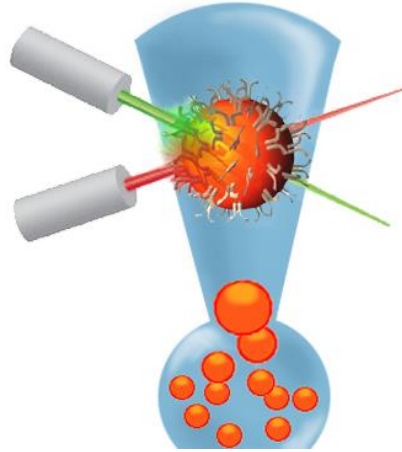
Su funcionamiento se basa en el uso de microesferas en cuya superficie se adhiere el antígeno o anticuerpo que queramos utilizar, similar a como se adhieren en el fondo de cada pocillo de un ELISA. Al tratarse de esferas en suspensión, el contacto entre las microesferas, los componentes presentes en la muestra y los reactivos se ve facilitado, así como la eficacia de los lavados. Para evitar que durante estos lavados las microesferas sean desechadas, estas son magnéticas. Tras añadir la solución de lavado a los pocillos, la placa se sitúa sobre una base de imanes que fijan las esferas en el fondo, para así evitar que sean arrojadas al retirar el líquido (Figura 5).



**Figura 5. Base con imanes de la marca Bio-Plex® para el lavado manual de placas de 96 pocillos, utilizada en la tecnología Luminex®.** Atraídas por los imanes, las microesferas magnéticas son fijadas en el fondo del pocillo, evitando que sean desechadas durante los lavados [Imagen propia].

Para cada ensayo se añaden millones de microesferas a cada pocillo, midiéndose cientos de ellas, lo que otorga robustez al ensayo, y se obtiene el valor de la mediana de la

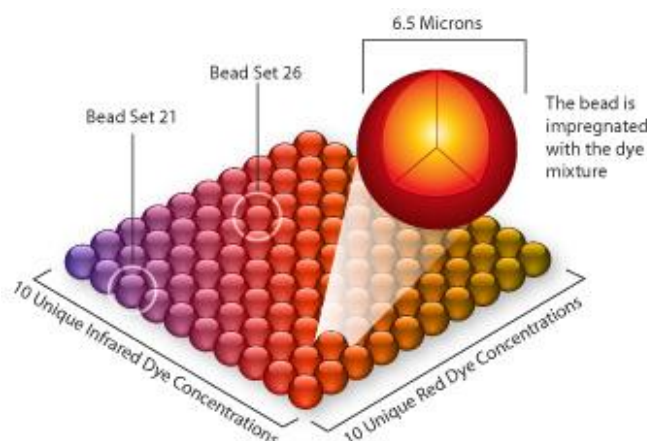
intensidad de la fluorescencia. El dispositivo utilizado para la lectura del resultado es similar a un citómetro de flujo convencional. Las microesferas son obligadas a ascender en línea a través de un capilar donde inciden sobre ellas dos láseres, uno verde y otro rojo (Figura 6).



**Figura 6. Esquema del sistema de lectura de Luminex®.** Las microesferas ascienden en línea por la columna donde dos láseres inciden sobre cada una de ellas. El láser rojo permite reconocer el tipo de bola y con el láser verde medir la cantidad de marcador sobre la superficie de la esfera para poder determinar el resultado de la prueba [Elaboración propia. Fuente imágenes láseres y microesfera más grande: Luminex Corporation].

El láser verde, de 532nm, excita el fluorocromo marcador de la reacción (ficoeritrina, Alexa 532 o Cy3), cuya presencia o ausencia en la superficie de la microesfera revela el resultado del experimento (Dunbar, 2006).

El láser rojo, de 635nm, permite determinar el tipo de microesfera que está siendo analizada. Y es que de esta característica deriva la principal ventaja de esta técnica, la capacidad de realizar análisis *multiplex* determinando en un mismo pocillo hasta 100 analitos diferentes (Elshal y McCoy, 2006), reduciendo el coste, el tiempo y el volumen de muestra necesarios. Esto es debido a que existen 100 tipos de microesferas fluorescentes diferentes en función de la cantidad de fluoróforo rojo e infrarrojo que contienen (Figura 7). El lector es capaz de reconocer el tipo al que pertenece cada una de las bolas leídas mediante el láser rojo y, en consecuencia, medir como distintos experimentos aquellos ocurridos en cada tipo de esfera. Recientemente, Luminex Corporation ha desarrollado un nuevo equipo llamado FLEXMAP 3D que amplía la capacidad de determinar hasta 500 analitos simultáneamente. Esta ampliación tiene lugar gracias a la combinación del panel de microesferas anterior (Figura 7) con un fluoróforo naranja que puede estar presente en cinco concentraciones diferentes, multiplicando por cinco las opciones.



**Figura 7. Panel de microesferas fluorescentes disponibles para los equipos Luminex 100® y Luminex 200®.** Cada tipo de microesfera contiene fluoróforos rojos e infrarrojos, en una proporción y cantidad conocidas, lo que permite al lector identificar el tipo de esfera que está midiendo y así poder realizar 100 determinaciones simultáneamente al utilizar todos los tipos de esferas para determinar diferentes analitos [Fuente: Luminex Corporation].

El lector cuenta con 4 detectores que miden la señal fluorescente generada por los láseres incidiendo sobre las microesferas. Tres de ellos permiten determinar el tipo de esfera que está siendo analizada, ya que uno de ellos mide el tamaño de la esfera, para poder descartar los agregados de microesferas, aquellas rotas o defectuosas u otros artefactos como burbujas; y los otros dos miden la cantidad de fluoróforo rojo e infrarrojo, respectivamente, de cada microesfera. El cuarto detector calcula el resultado del experimento, ya que mide la intensidad de la señal producida por el láser verde al incidir sobre la esfera.

Además de inmunoensayos, la tecnología Luminex® permite evaluar la actividad enzimática (Bachovchin *et al.*, 2014), realizar ensayos de unión ligando-receptor, y la detección de ácidos nucleicos mediante hibridación (Dunbar, 2006).

Esta novedosa tecnología está comenzando a ser aplicada al ámbito veterinario (Christopher- Hennings *et al.*, 2013) (Tabla 3). Cabe destacar algunas de estas aplicaciones, como la realizada por Clavijo *et al.* (2006), que desarrollaron un ensayo *multiplex* para la detección de anticuerpos frente a cuatro proteínas no estructurales del virus de la fiebre aftosa en ganado bovino, permitiendo diferenciar entre animales vacunados e infectados. Posteriormente, en 2011, Anderson *et al.* diseñaron un ensayo *multiplex* para la determinación de anticuerpos frente a herpesvirus bovino 1, virus parainfluenza 3, virus de la diarrea vírica bovina y virus respiratorio sincitial bovino. También en 2011 (b), Wagner *et*



*al.* describieron un ensayo *multiplex* para la detección de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en caballo, siendo esta metodología *multiplex* más sensible que las técnicas Western blot para las mismas determinaciones. En 2012, Giménez-Lirola *et al.* presentaron una técnica para la determinación de anticuerpos frente a *Erysipelothrix* spp. en cerdos. La sensibilidad de esta técnica era superior a dos ELISAs comerciales e igual a la de un ELISA desarrollado por el mismo equipo. En 2015, Sánchez-Matamoros *et al.* desarrollaron una técnica Luminex® para la determinación de anticuerpos frente al virus de la peste equina africana capaz de detectarlos a partir del día 7 post infección, frente al ELISA que lo hizo a partir del día 13. Recientemente, en 2016, Sánchez-Matamoros *et al.* incluyeron esta determinación en una técnica *multiplex* que detecta también anticuerpos frente a otra proteína del mismo virus, permitiendo diferenciar entre animales infectados y vacunados. También en 2016, Hoare *et al.* han aplicado por primera vez la tecnología Luminex® a la detección de un patógeno que afecta a los peces, el virus de la anemia infecciosa del salmón, en suero de salmón atlántico.

Animales	Determinación	Publicación
Salmones	V. de la anemia infecciosa del salmón	Hoare <i>et al.</i> , 2016
Aves	Ac frente a v. Influenza A	Watson <i>et al.</i> , 2009
Aves	Ac frente a v. del Nilo occidental, v. de la encefalitis de Saint Louis, v. de la encefalitis equina del este	Basile <i>et al.</i> , 2010
Roedores	V. ectromelia, v. vaccinia, v. de la diarrea epizootica del ratón recién nacido, v. entérico huérfano, v. de la hepatitis del ratón, v. Sendai, v. de la encefalomiелitis murina de Theiler, parvovirus murino, citomegalovirus murino y v. diminuto del ratón y <i>Mycoplasma pulmonis</i>	Khan <i>et al.</i> , 2005
Roedores	Ac frente a norovirus murino 1	Hsu <i>et al.</i> , 2005
Cerdos	Ac frente a <i>Staphylococcus aureus</i> sensibles a meticilina	Crombé <i>et al.</i> , 2013
Cerdos	Ac frente a <i>Trichinella spiralis</i> y <i>Toxoplasma gondii</i>	Bokken <i>et al.</i> , 2012
Cerdos	Ac frente a <i>Trichinella</i>	van der Wal <i>et al.</i> , 2013
Cerdos	Ac frente a <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Giménez-Lirola <i>et al.</i> , 2012
Cerdos	Ac frente a v. de la diarrea epidémica porcina, v. de PRRS, v. de la influenza porcina, y circovirus porcino 2	Ransburgh, 2015
Cerdos	Ac frente al v. de PRRS y circovirus porcino 2	Lin <i>et al.</i> , 2011
Cerdos	Ac frente al v. del PRRS	Langenhorst <i>et al.</i> , 2012
Cerdos	Ac frente al v. de la peste porcina africana en muestras de suero y fluido oral	Giménez-Lirola <i>et al.</i> , 2016

Animales	Determinación	Publicación
Súidos	Diferenciación de los 22 genotipos del v. de la peste porcina africana	Leblanc <i>et al.</i> , 2013
Porcino, ovino y bovino*	V. de la diarrea vírica bovina 1 y 2, v. de la peste porcina clásica y v. de la enfermedad de frontera	Deregt <i>et al.</i> , 2006
Bovino, ovino, caprino y porcino	Ac frente al v. de la fiebre aftosa	Clavijo <i>et al.</i> , 2006; Perkins <i>et al.</i> , 2007
Bovinos	Ac frente a herpesvirus bovino 1, parainfluenza 3, v. de la diarrea vírica bovina y v. respiratorio sincitial bovino	Anderson <i>et al.</i> , 2011
Bovinos	Ac frente a pestivirus	Vijayaraghavan <i>et al.</i> , 2012; Larska <i>et al.</i> , 2013
Bovinos	Identificación de <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>M. mycoides cluster</i> , <i>M. m. mycoides</i> tipo SC y <i>M. capricolum capripneumoniae</i>	Righter <i>et al.</i> , 2011
Bovinos	<i>Babesia divergens</i> , <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>B. major</i> , <i>B. occultans</i> , <i>Theileria annulata</i> y <i>T. buffeli</i>	Ros-García <i>et al.</i> , 2012a; Ros-García <i>et al.</i> , 2012b
Bovinos, ovinos, caprinos y cérvidos	Genotipado de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> tipo I, II y III	Gastaldelli <i>et al.</i> , 2011
Ciervos	Ac frente a <i>Borrelia burgdorferi</i>	Kirchgessner <i>et al.</i> , 2013
Caballos	Ac frente a <i>Borrelia burgdorferi</i>	Wagner <i>et al.</i> , 2011b; Wagner <i>et al.</i> , 2013
Caballos	Ac frente al v. del Nilo occidental	Balasuriya <i>et al.</i> , 2006
Caballos	Ac frente a v. del Nilo occidental, v. de la encefalitis japonesa y v. de la encefalitis transmitida por garrapatas	Beck <i>et al.</i> , 2015
Caballos	Ac frente al v. de la peste equina africana	Sánchez-Matamoros <i>et al.</i> , 2015; Sánchez-Matamoros <i>et al.</i> , 2016
Équidos	Ac frente a v. de la arteritis equina	Go <i>et al.</i> , 2008
Perros	Ac frente a <i>Borrelia burgdorferi</i>	Wagner <i>et al.</i> , 2011a; Wagner <i>et al.</i> , 2012
Varios	Pestivirus (v. de la peste porcina clásica, v. de la diarrea vírica bovina y v. de la enfermedad de frontera)	Leblanc <i>et al.</i> , 2009
Varios	Detección e identificación de los virus Hendra y Nipah	Foord <i>et al.</i> , 2013

**Tabla 3. Técnicas Luminex® desarrolladas para la detección de patógenos o anticuerpos en veterinaria.**

Se detalla la especie/grupo animal objeto de estudio, la determinación realizada y la publicación relacionada. Ac: anticuerpos. V.: virus. PRRS: síndrome respiratorio y reproductor porcino (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome). \*Diseñado con virus procedentes de infección de cultivos celulares. Aplicable a porcino, ovino y bovino [Elaboración propia].

La tecnología Luminex® es de reciente creación y, por ello, aún son relativamente escasas las técnicas que han sido puestas a punto en veterinaria, principalmente en su aplicación a la fauna silvestre (Christopher-Hennings *et al.*, 2013). Su aplicación a los animales de vida libre es de gran interés, especialmente la realización de ensayos *multiplex* que obtienen mucha información de un pequeño volumen de muestra, ya que son muy escasas y valiosas.

En esta tesis doctoral aplicamos esta técnica por primera vez en mamíferos marinos. Como primer paso hacia el desarrollo de un ensayo *multiplex* que permita la determinación de numerosos analitos simultáneamente, se aplicó esta tecnología a la determinación de anticuerpos frente a *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

#### 1.3.2.1 Detección de anticuerpos frente a *Erysipelothrix rhusiopathiae* en cetáceos

Esta enfermedad es de especial importancia en cetáceos en cautividad ya que es una zoonosis, está relacionada con la calidad del alimento y su manejo y la vacunación es muy frecuente. En este contexto, el estudio de la presencia de anticuerpos es de gran utilidad en la valoración de la eficiencia de los programas de vacunación (Lacave *et al.*, 2001; Sitt *et al.*, 2010; Bernal-Guadarrama *et al.*, 2014b). En los animales que no se encuentran vacunados, como son las crías y también en los animales procedentes de vida libre, la determinación de anticuerpos permite conocer si se ha producido una exposición anterior a la bacteria y ayudar en el diagnóstico de la patología. Además, el estudio de la presencia de anticuerpos frente a esta bacteria puede representar un buen parámetro para medir la salud de las poblaciones en libertad.

Teniendo en cuenta la importancia de erisipela en la sanidad de los mamíferos marinos, es necesario el desarrollo de técnicas sensibles y específicas que permitan la determinación de anticuerpos frente a la bacteria. El uso de la tecnología Luminex® se ha demostrado muy ventajoso y sensible en diversas aplicaciones a la medicina humana y veterinaria. Además, su utilización en cetáceos permitiría aprovechar enormemente la cantidad de muestra, muy valiosas por su dificultad de obtención y por la escasez de animales silvestres que pueden ser estudiados.

Además del interés del estudio de los anticuerpos frente a *E. rhusiopathiae* por sí mismo, al ser el patógeno frente al que se realiza vacunación en los animales en cautividad, es quizás el mejor primer paso para desarrollar esta tecnología en su aplicación a los cetáceos. Debido a que se cuenta con gran número de animales con anticuerpos cuya cantidad puede estudiarse en el tiempo entre las revacunaciones; de crías sin vacunar; y su valoración en individuos en libertad es de gran interés.

### 1.3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Los métodos de diagnóstico molecular más comúnmente usados en la actualidad en el diagnóstico de enfermedades infecciosas son la PCR y la secuenciación.

La PCR se basa en el diseño y utilización de unas secuencias cortas (alrededor de 18-25 nucleótidos) denominadas cebadores (también conocidos como *primers*) complementarias al inicio (*forward*) y el final (*reverse*) del fragmento que será amplificado. Por ello, se requiere un conocimiento previo de la secuencia que se desea amplificar. De forma general, para la realización de una técnica PCR se mezcla la muestra con los cebadores, la enzima ADN polimerasa, los nucleótidos libres que utilizará la enzima y, dependiendo del caso, otros elementos que faciliten la reacción. Una vez preparada, la mezcla se introduce en el termociclador, que la someterá a repetidos cambios de temperatura que permitirán la amplificación. En primer lugar, una temperatura de 94-95 °C produce la **desnaturalización** del ADN, separando las dos hebras. Un descenso en la temperatura facilita la posterior unión de los cebadores a las hebras de ADN, paso denominado **anillamiento**. Su temperatura depende de las características específicas de los cebadores y de su afinidad por la secuencia a amplificar, por lo que es propia de cada técnica. Una vez los cebadores se encuentran unidos a la secuencia, se produce una elevación de la temperatura hasta unos 72-78 °C, variable en función de la enzima, para la fase de **elongación** o **extensión**. En esta fase la enzima utiliza los nucleótidos libres para copiar la hebra molde, obteniendo así una hebra complementaria. Mediante la repetición cíclica de estas fases, las hebras nuevas pasarán a ser también hebras molde en el siguiente ciclo obteniendo una amplificación exponencial del número de copias presentes al inicio del proceso. El **número de ciclos** varía en función de cada técnica siendo normalmente superior a 30 (Sambrook y Russell, 2001).

La ADN polimerasa sólo puede amplificar a partir de ADN, por ello, si se desea amplificar una secuencia de ARN es necesario realizar un proceso de retrotranscripción (RT) previo a la PCR mediante el que se obtiene ADN complementario (ADNc). Estos dos procesos pueden realizarse en dos pasos o en uno, denominándose entonces RT-PCR.

Mediante PCR se pueden amplificar varias secuencias diferentes simultáneamente utilizando varias parejas de cebadores, lo que se conoce como PCR *multiplex*. Para ello, se debe tener en cuenta que las parejas de cebadores no pueden presentar alta afinidad para unirse entre ellas; presentar temperaturas de anillamiento similares; y poder utilizar el mismo protocolo de temperaturas.

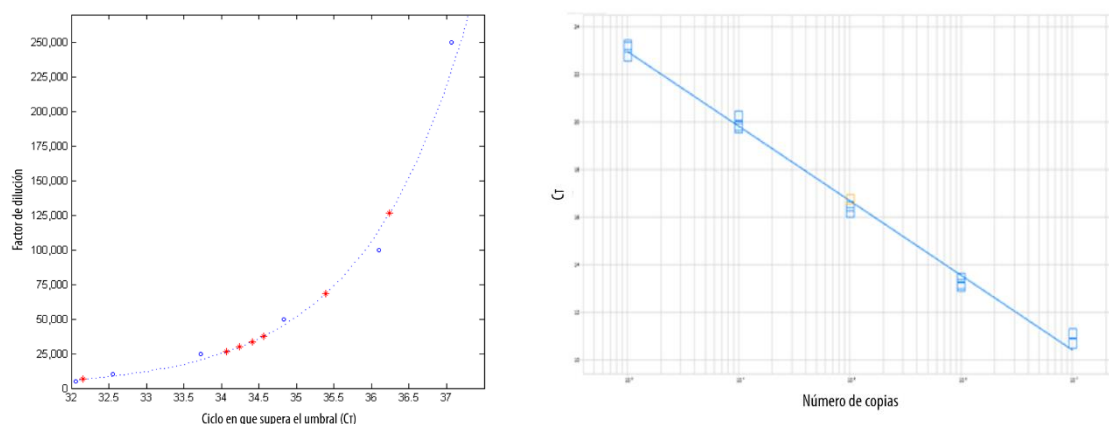
Para aumentar la sensibilidad de las técnicas, es decir, poder detectar menor cantidad de patógeno en la muestra, una opción es el diseño de una PCR anidada. Se basa en la realización de dos PCRs, una primera PCR (externa) que amplifica un fragmento dentro del cual se encuentra el que amplificará la segunda PCR (interna) en la que se usa de muestra el producto de la PCR externa. Así se aumenta el número de copias inicial en la segunda PCR y somete a la muestra original a la amplificación en muchos más ciclos de los que podrían realizarse en una única PCR.

Existen diferentes tipos de PCR (Sambrook y Russell, 2001):

**PCR convencional:** para la visualización del resultado se somete a los productos de la PCR a un proceso de electroforesis en gel de agarosa. Así, se consigue la separación en bandas en función del tamaño del segmento amplificado. Al utilizar también un marcador de peso molecular con bandas de fragmentos con un número de pares de bases conocidos, es posible calcular la longitud del segmento amplificado. El resultado será positivo cuando obtengamos una banda a la altura esperada. Permite realizar una semicuantificación relativa entre dos muestras en un mismo gel en función de la intensidad o grosor de la banda, pero no una cuantificación real.

**PCR en tiempo real:** esta técnica permite visualizar el resultado de la prueba mientras está teniendo lugar y directamente en una pantalla. El termociclador empleado es capaz de medir la fluorescencia en cada ciclo, mostrando en una gráfica su progresión a lo largo del

protocolo. Se determina un umbral de fluorescencia y, en función del ciclo en que se supere ( $C_T$ ), se puede medir la concentración de la secuencia en la muestra al inicio de la prueba. Para ello, se puede comparar la muestra con otra usada como referencia, es decir, realizar una cuantificación relativa. O bien, a partir de una muestra con un número de copias conocido y sus diluciones decimales realizar una curva estándar con el  $C_T$  frente al número de copias, que se convierte en una recta estándar al mostrar el  $C_T$  frente al  $\log_{10}$  del número de copias (Figura 8). Al extrapolar en esta recta el  $C_T$  de la muestra problema se obtendrá el número de copias que contenía al comenzar la PCR, realizando así una cuantificación absoluta. Los requisitos para considerar una muestra positiva son diferentes dependiendo de la metodología. Por una parte, la **fluorescencia** puede ser generada **por marcadores inespecíficos** como bromuro de etidio o SYBR Green, que se unen inespecíficamente a cualquier ADN de doble cadena generado durante la PCR. En este caso, una muestra no puede considerarse positiva únicamente por tener un  $C_T$ , ya que puede tratarse de otros segmentos de ADN de doble cadena como dímeros de *primer* o amplificaciones inespecíficas. Para diferenciarlo, además de analizar el  $C_T$ , al finalizar la PCR se analiza la gráfica de la curva de disociación, obtenida al medir la fluorescencia a diferentes temperaturas de un amplio rango. La temperatura a la que se registre el pico de fluorescencia dependerá de la longitud del fragmento amplificado y de su composición específica de nucleótidos. Así, el resultado será positivo si la temperatura a la que alcanza el pico de fluorescencia la muestra problema se corresponde con el establecido para la secuencia que buscamos. Por otra parte, la **fluorescencia** puede ser **generada por sondas** al unirse específicamente a una secuencia determinada que se localiza entre las complementarias a los dos cebadores. En este tipo de técnica, el resultado será positivo cuando obtengamos un  $C_T$ . Al no ser necesaria la interpretación de la curva de disociación, esta técnica puede analizarse mientras está teniendo lugar. Además, utilizando más de una sonda con diferentes marcadores de fluorescencia que puedan ser medidos simultáneamente, podremos realizar más determinaciones al mismo tiempo: utilizando parejas de cebadores y sonda distintas para determinar más de una secuencia diferente o utilizar distintas sondas para evidenciar las variaciones dentro del fragmento delimitado por un único par de cebadores.



**Figura 8. Curva y recta estándar para la cuantificación en función del ciclo en que se supera el umbral de fluorescencia ( $C_T$ ).** Curva (izquierda) que representa el factor de dilución de una muestra positiva (también puede realizarse con el número de copias) frente al  $C_T$ . Los puntos azules muestran los valores de las diluciones de la muestra usada como referencia y los puntos rojos las muestras problema. Recta (derecha) que representa el  $\log_{10}$  del número de copias presentes al comienzo de la PCR frente al  $C_T$  [Elaboración propia].

A pesar de que las PCRs normalmente permiten un diagnóstico fiable, amplificando de forma específica el fragmento deseado, la secuenciación del producto obtenido presenta grandes ventajas. Por una parte, nos permite confirmar el diagnóstico, comprobando que efectivamente se ha amplificado la secuencia correcta. Por otra parte, nos permite estudiar la secuencia, comparándola con otras registradas en diversas bases de datos y realizando un análisis filogenético para estudiar la relación entre ellas. Además, si conocemos la secuencia de nuestro control positivo y de las muestras y son diferentes, podemos descartar completamente que se deba a una contaminación.

### 1.3.3.1 Determinación de herpesvirus y poxvirus mediante PCR y análisis filogenético

En el estudio de las patologías que afectan a los mamíferos marinos es fundamental la valoración global de los hallazgos anatomopatológicos, histológicos, toxicológicos, bacteriológicos y virológicos. Sin embargo, si centramos la atención únicamente en aquellos tejidos que presentan lesiones macro y/o microscópicas perderemos mucha información sobre la relación entre los patógenos y los mamíferos marinos. Para entender mejor herpesvirus y poxvirus, los tejidos diana de cada tipo de virus, la relación con las lesiones que pueda producir, su prevalencia y evolución en las poblaciones, etc... resulta de gran interés la amplificación de sus ácidos nucleicos mediante PCR en tejidos con o sin lesión.



Como hemos repasado, herpesvirus en mamíferos marinos se ha descrito como causa de la muerte (Blanchard *et al.*, 2001), en tejidos con lesiones muy graves (Esperón *et al.*, 2008; Arbelo *et al.*, 2010; Soto *et al.*, 2012; Sierra *et al.*, 2014; van Elk *et al.*, 2016), incluso en tejidos sin lesión (Bellière *et al.*, 2010; van Elk *et al.*, 2016). Debido a que herpesvirus puede mantener infecciones latentes (Speck y Ganem, 2010; Penkert y Kalejta, 2011), el ADN del virus podría amplificarse sin que esté ocurriendo replicación viral ni el virus esté produciendo ninguna lesión. Por ello, es fundamental la determinación de ARN con la secuencia de herpesvirus (ARN mensajero) que nos permite evaluar si se está produciendo replicación viral o si el virus se encuentra en periodo de latencia. Para esto, es necesario realizar siempre de forma simultánea la determinación de ARN de un gen constitutivo (conocidos como *housekeeping*) cuya expresión se produce en todas las células de forma constante. Así, en el caso de ausencia de ARN con la secuencia de herpesvirus podremos asegurarnos de si se debe a que se encuentre en estado latente (amplificaríamos ARN con la secuencia del gen constitutivo) o si el estado de conservación de la muestra no es el adecuado y el ARN se ha degradado (no habría ARN del gen constitutivo). El ADN es más resistente a la degradación que el ARN, por lo que en una muestra podríamos determinar ADN de herpesvirus y no ARN y que la ausencia de este último se debiese al estado de la muestra.

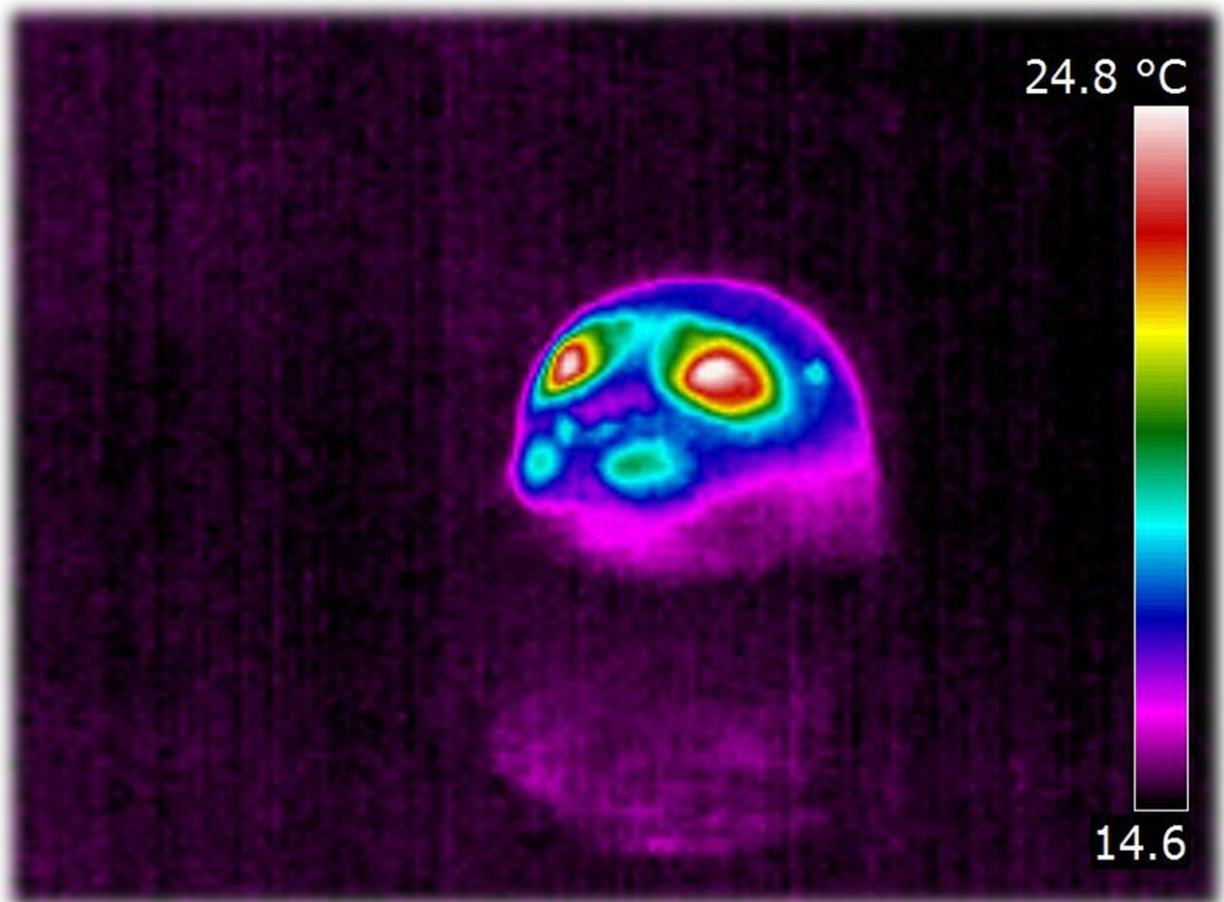
Por otra parte, el análisis filogenético de las secuencias de herpesvirus y poxvirus amplificadas en los diferentes tejidos nos permite estudiar la posible relación entre el tipo de virus, el tejido en que se encuentra y la lesión que pueda producir; y la relación entre dos virus encontrados en diferentes animales de la misma o diferente especie.

Para la amplificación de herpesvirus, la PCR más comúnmente referida en las publicaciones de mamíferos marinos es la de VanDevanter *et al.* (1996), una PCR convencional anidada que amplifica un fragmento del gen que codifica para la ADN polimerasa de herpesvirus en especies animales muy diversas, ya que es una región bien conservada. Otras PCRs utilizadas con frecuencia como complemento en el estudio de herpesvirus son las diseñadas por Hargis *et al.* (1999) y por Ehlers *et al.* (2008) que amplifican fragmentos de los genes que codifican para la terminasa y la glicoproteína B, respectivamente.



Para la amplificación de poxvirus, las PCR más utilizadas en estos animales son las diseñadas por Bracht *et al.* (2006). Esta publicación recoge seis PCRs específicamente desarrolladas para su uso en mamíferos marinos que permiten amplificar fragmentos de distintos genes que codifican para la ADN polimerasa de poxvirus, ADN topoisomerasa I de poxvirus, hemaglutinina de orthopoxvirus, ADN polimerasa de parapoxvirus, ADN topoisomerasa I de parapoxvirus y proteína de la envuelta de parapoxvirus.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



Fuente de la imagen: Imagen propia.

## JUSTIFICACIÓN

La conservación y el bienestar de los mamíferos marinos provocan un gran interés por ser marcadores de la salud del ecosistema marino, íntimamente ligada a la salud de las poblaciones humanas, en particular las costeras, y a todas en general a través del consumo de productos marinos. Su conservación y protección tiene un efecto directo y muy beneficioso no sólo sobre los propios mamíferos marinos sino también sobre todas las especies con las que comparten hábitat y, especialmente, con aquellas que se encuentran en su cadena trófica.

Además, se trata de animales muy carismáticos que producen gran empatía en la población. Esta característica favorece enormemente la concienciación de la sociedad sobre la necesidad de la conservación de estas especies y, por extensión de otras especies marinas mucho menos carismáticas pero igualmente imprescindibles. Este carisma conlleva también que aquellos individuos mantenidos en cautividad sean un gran reclamo para el público y tengan un papel fundamental en las labores de sensibilización y educación de la población que realizan los parques zoológicos.

La importancia y el interés de su estudio y conservación contrastan, sin embargo, con la escasez de técnicas diagnósticas y de control específicas, de conocimientos sobre los agentes que les afectan, las vías de transmisión, las enfermedades que sufren, las posibles actuaciones concretas para mejorar su situación sanitaria, etc. Que, si bien el conocimiento sobre los mamíferos marinos ha aumentado de forma notable en las últimas décadas, aún queda mucho por descubrir y comprender.

El estudio de estos animales presenta una gran dificultad logística, carece en gran medida de herramientas de diagnóstico específicas y resulta muy complicado el estudio de un gran número de ejemplares de cada especie para poder valorarlas de forma independiente.

Además, la dificultad específica del estudio de la sanidad de los mamíferos marinos de vida libre radica en la gran complejidad que supone diseñar y desarrollar técnicas directamente sobre estos animales y el difícil acceso a las muestras. Así, sólo podemos evaluar ejemplares varados vivos o en diferentes estados de descomposición, lo que otorga un enorme valor a cada uno de los individuos que pueden estudiarse pero a la vez introduce un gran sesgo en la muestra poblacional. Al mismo tiempo, desconocemos su historia clínica previa;

la población a la que pertenecen; los factores y condiciones que afectan a las mediciones se encuentran fuera de nuestro control, estandarización y comparación; y el estudio se limita en el plano temporal al momento del varamiento, en el que sufren un estrés notable.

Por todo ello, el estudio complementario de los ejemplares procedentes de cautividad resulta fundamental, por la repercusión directa sobre estos individuos y, especialmente, por la posibilidad de desarrollar y aplicar técnicas que posteriormente pueden adaptarse a individuos en libertad. Ya que se trata de ejemplares sanos, de diversas edades y de historial conocido, que se encuentran en condiciones ambientales controladas y en su entorno habitual, reduciendo así el estrés, y cuyo análisis puede realizarse a lo largo del tiempo.

Siendo evidente la importancia del estudio de la sanidad de los mamíferos marinos y su dificultad, en esta tesis planteamos la necesidad de desarrollar, adaptar y aplicar diferentes herramientas de diagnóstico y detección temprana para favorecer la adquisición de una visión más global de las enfermedades que les afectan, tanto en libertad como en cautividad.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de esta tesis doctoral es ampliar el conocimiento de la sanidad de los mamíferos marinos mediante la aplicación y el desarrollo de diferentes herramientas de diagnóstico que permitan la detección precoz y el estudio de agentes infecciosos de gran relevancia como *Erysipelothrix rhusiopathiae*, herpesvirus y poxvirus.

## OBJETIVOS CONCRETOS

Con la finalidad de alcanzar el objetivo principal planteado, las herramientas elegidas por sus numerosas ventajas y aplicaciones fueron:

- Termografía para la medición de la temperatura corporal a distancia
- Desarrollo de una metodología Luminex® para la determinación de anticuerpos
- Biología molecular y el análisis filogenético para el estudio virológico

Así, se han establecido los siguientes objetivos concretos:

**Objetivo 1:** Establecer puntos y valores de referencia de la temperatura corporal mediante termografía en mamíferos marinos.

Para ello, se estudiaron las características termográficas de diferentes puntos anatómicos en cinco especies de mamíferos marinos, con el objetivo de poder evaluar la temperatura corporal de una forma rápida, segura y a distancia, sin producir estrés en el animal. Lo que permitiría realizar un diagnóstico precoz y no invasivo de diferentes procesos patológicos.

**Objetivo 2:** Estudiar la patología producida por *Erysipelothrix rhusiopathiae* en cetáceos en libertad y mejorar las herramientas de detección de anticuerpos frente a esta bacteria.

Concretamente, se estudió desde el punto de vista clínico, bacteriológico e histopatológico el primer caso clínico de erisipela en un delfín mular de vida libre. Además, se desarrolló una técnica de Luminex® para la detección de anticuerpos en diferentes especies de cetáceos, que permite evaluar la interacción entre la bacteria y los cetáceos, así como la efectividad de la vacunación.

**Objetivo 3:** Analizar la presencia de diferentes virus en mamíferos marinos de cautividad y de vida libre.

Con este fin, se analizaron muestras de animales mantenidos en cautividad y de cetáceos varados. Así, se detectó y estudió por primera vez la presencia de herpesvirus y poxvirus en una morsa del Pacífico residente en el Oceanogràfic de Valencia, así como de herpesvirus en un rorcual común y un rorcual aliblanco varados. Además del estudio de estos casos clínicos, para comprender mejor la relación entre herpesvirus y los cetáceos se determinó la presencia del virus en todos los tejidos de cetáceos varados en la Comunidad Valenciana durante tres años.

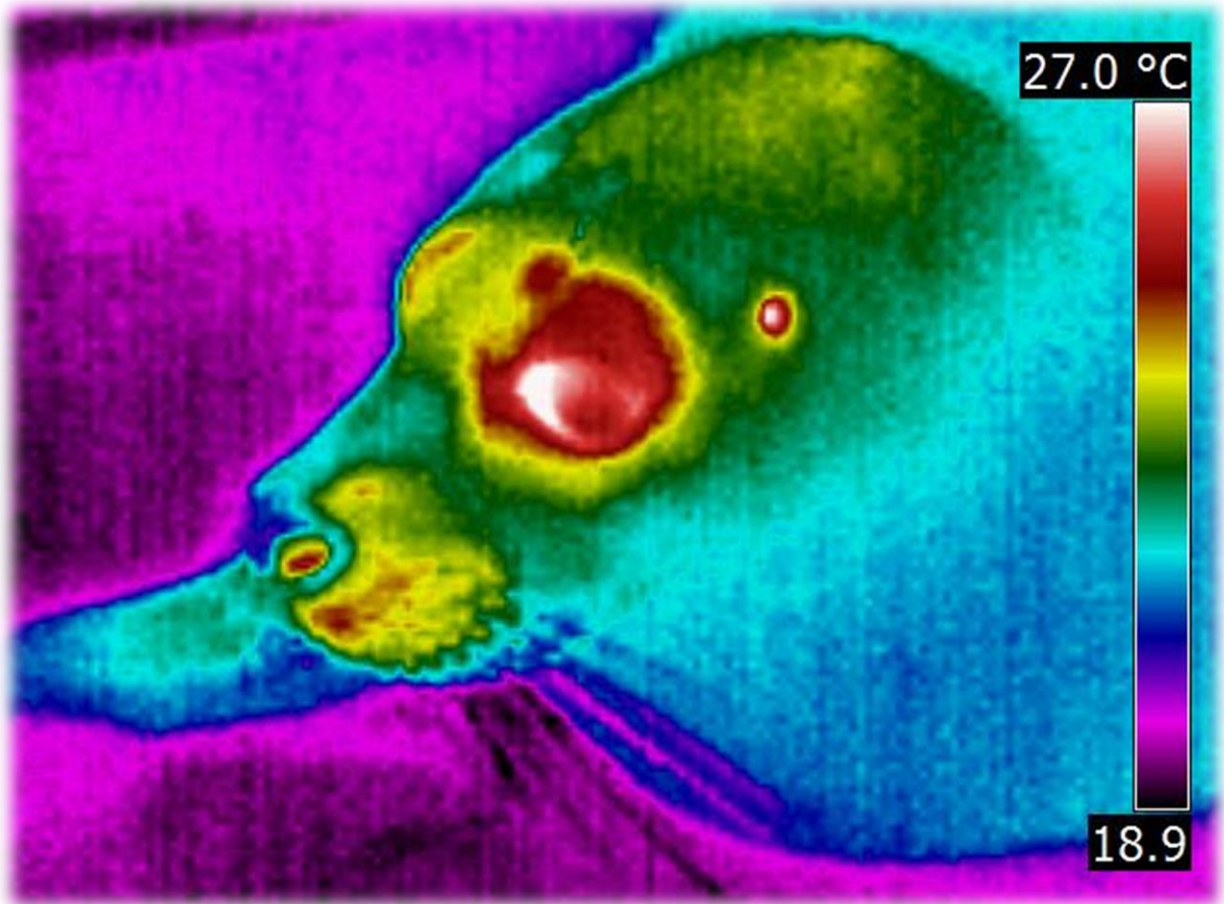
### 3. RESULTADOS





Fuente de la imagen: [FreeImages.com/hollyereid](https://www.freeimages.com/photo/1144444).

## OBJETIVO 1:



ESTABLECER PUNTOS Y VALORES DE  
REFERENCIA DE LA TEMPERATURA  
CORPORAL MEDIANTE TERMOGRAFÍA EN  
MAMÍFEROS MARINOS

Fuente de la imagen: Imagen propia.

## RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 1

La temperatura corporal es un parámetro esencial en la valoración de la salud de los individuos y en la vigilancia sanitaria de las poblaciones. Por ello, resulta de vital importancia poder evaluarla y detectar las posibles variaciones de la misma. Su medición es difícil en la fauna silvestre, por lo que es importante la aplicación de técnicas no invasivas que permitan medirla a distancia, como la termografía.

Sin embargo, como ocurre en la mayoría de las especies de fauna silvestre, en mamíferos marinos no están establecidos los puntos termográficos de referencia de la temperatura general ni su valor normal.

Con el objetivo de establecer una referencia termográfica de la temperatura general, se evaluaron diferentes puntos anatómicos en mamíferos marinos mantenidos en cautividad en condiciones controladas. Concretamente, se estudiaron ojo y espiráculo en dos especies de cetáceos (delfín mular, beluga); y oído, ojo, fosas nasales, área de las vibrisas, boca y axilas en tres especies de pinnípedos [león marino de la Patagonia; foca común y morsa del Pacífico (*Odobenus rosmarus divergens*)].

Los resultados obtenidos mostraron que el mejor punto anatómico para evaluar mediante termografía la temperatura corporal en cetáceos fue la mucosa del interior del espiráculo. Cuando ésta se midió durante una respiración voluntaria y situando la cámara perpendicular al eje longitudinal del animal, el valor máximo fue prácticamente idéntico a la temperatura rectal (utilizada como referencia) en delfín mular y 1 °C inferior en beluga.

En pinnípedos, el ojo resultó el mejor punto de referencia de la temperatura general. El tiempo fuera del agua necesaria para que se estabilizase la temperatura ocular y el valor de la misma fue específico de cada especie. En león marino de la Patagonia, tras 10 minutos la temperatura fue de 31,13 °C; en foca común, tras 10 minutos fue de 32,27 °C; y en morsa del Pacífico, tras 5 minutos, fue de 29,93 °C.

## Publicación principal de este objetivo

Melero, M., Rodríguez-Prieto, V., Rubio-García, A., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015). Thermal reference points as an index for monitoring body temperature in marine mammals. *BMC Research Notes*, 8, 411.

## Aportaciones científicas relacionadas

### ■ Publicaciones científicas indexadas

- ♦ Rodríguez-Prieto, V., Rubio-García, A., Melero, M., García, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013). Identification of the pattern of appearance and development of thermal windows in the skin of juvenile Pacific walruses (*Odobenus rosmarus divergens*) in a controlled environment. *Marine Mammal Science*, 29(1), 167-176.

### ■ Publicaciones científicas de divulgación

- ♦ Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2010). Aplicación de la termografía a la fauna salvaje. *Profesión Veterinaria*, 17(74), 78-83.
- ♦ Melero, M., López, I., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2010). Aplicación de la termografía en el diagnóstico y valoración de la pododermatitis plantar en rapaces. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias (RCCV)*, 4(2), 61-68.
- ♦ Melero, M., Mendoza, J.L., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2010). Diagnóstico y seguimiento termográfico de electrocución y fractura de radio en un águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias (RCCV)*, 4(2), 69-77.
- ♦ Melero, M., Casado, S., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2009). Aplicación de la termografía en la valoración de la fertilidad en huevos de cernícalo primilla. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias (RCCV)*, 3(2), 60-68.
- ♦ Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2009). Aplicación de la termografía para el estudio de los koalas. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias (RCCV)*, 3(2), 51-59.

## ■ Ponencias

- ♦ Melero, M. (2014). Termografía en fauna salvaje: aplicaciones y casos clínicos. *Curso Rol del veterinario en zoológicos y centros de recuperación*. Barcelona.
- ♦ Melero, M. (2013). Termografía en fauna salvaje. *I Curso Biomedicina en animales salvajes*. Madrid.
- ♦ Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2009). Nuevas aplicaciones de la termografía para el estudio de la vida salvaje. *II Congreso multitemático*. Madrid.
- ♦ Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2008). Termografía en animales salvajes y de zoo. *I Curso de técnicas de diagnóstico por Imagen en animales salvajes, exóticos y de zoo*. Madrid.

## ■ Congresos internacionales (comunicaciones orales)

- ♦ *39th Congress of the International Association for Aquatic Animal Medicine (IAAAM)*. Roma, Italia. 2008:
  - Rubio, A., Rodríguez-Prieto, V., Melero, M., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Thermography in walruses: preliminary considerations on thermoregulation.
- ♦ *36th Conference of the European Association of Aquatic Mammals (EAAM)*. Kolmården, Suecia. 2008:
  - Melero, M., García-Párraga, D., Rodríguez, V., Rubio, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M. New generation thermographic cameras: a readily available technique with a high potential for the marine mammal practitioner.

## ■ Congresos nacionales (comunicaciones orales)

- ♦ *VI Jornadas Complutense, V Congreso Nacional de Investigación para Alumnos de Pregrado en Ciencias de la Salud y X Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas*. Madrid. 2011:
  - Melero, M., Aguilar, L., García-Millán, I., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía al diagnóstico y seguimiento de

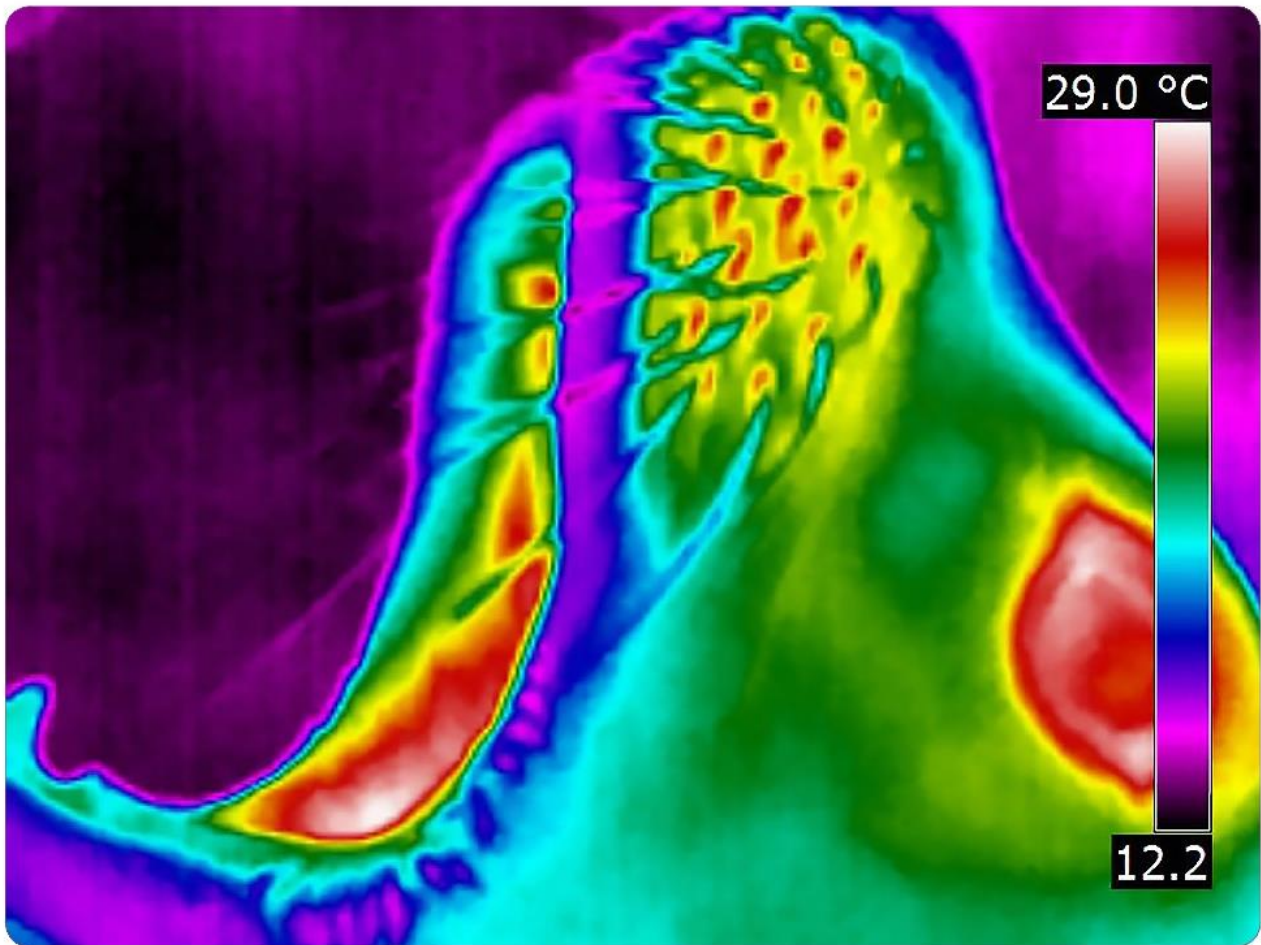
gestación en animales de zoo.

- Melero, M., García-Millán, I., Aguilar, L., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía al estudio de diferentes mecanismos de termorregulación en animales de zoo.
- ♦ *V Jornadas Complutense, IV Congreso Nacional de Investigación para Alumnos de Pregrado en Ciencias de la Salud y IX Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.* Madrid. 2010:
  - Melero, M., López, I., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía en el diagnóstico y valoración de la pododermatitis plantar en rapaces.
  - Melero, M., Mendoza, J.L., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Diagnóstico y seguimiento termográfico de la electrocución y fractura de radio en un águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*).
- ♦ *VIII Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.* Madrid. 2009:
  - Melero, M., Casado, S., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía en la valoración de la fertilidad en huevos de cernícalo primilla.
  - Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía para el estudio de los koalas.
- ♦ *VII Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.* Madrid. 2008:
  - Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M., González, F. Aplicación de la termografía en la monitorización de la anestesia con Isoflurano.
  - Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M., González, F. Aplicación de la termografía en la valoración de la fertilidad en huevos de codorniz, águila-azor perdicera y águila real.
  - Melero, M., Rubio, A., Rodríguez, V., Sánchez-Vizcaíno, J.M., García-Párraga, D. Aplicación de la termografía para el estudio de los mamíferos marinos: delfín mular, beluga, león marino de la Patagonia y foca vitulina.

- Rodríguez, V., Rubio, A., Melero, M., García, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M.  
Detección de las ventanas térmicas en la morsa (*Odobenus rosmarus*).







## Thermal reference points as an index for monitoring body temperature in marine mammals

Melero *et al.*

## SHORT REPORT

## Open Access



# Thermal reference points as an index for monitoring body temperature in marine mammals

Mar Melero<sup>1\*</sup>, Víctor Rodríguez-Prieto<sup>1</sup>, Ana Rubio-García<sup>1</sup>, Daniel García-Párraga<sup>2</sup> and José Manuel Sánchez-Vizcaíno<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Monitoring body temperature is essential in veterinary care as minor variations may indicate dysfunction. Rectal temperature is widely used as a proxy for body temperature, but measuring it requires special equipment, training or restraining, and it potentially stresses animals. Infrared thermography is an alternative that reduces handling stress, is safer for technicians and works well for untrained animals. This study analysed thermal reference points in five marine mammal species: bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*); beluga whale (*Delphinapterus leucas*); Patagonian sea lion (*Otaria flavescens*); harbour seal (*Phoca vitulina*); and Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*).

**Results:** The thermogram analysis revealed that the internal blowhole mucosa temperature is the most reliable indicator of body temperature in cetaceans. The temperatures taken during voluntary breathing with a camera held perpendicularly were practically identical to the rectal temperature in bottlenose dolphins and were only 1 °C lower than the rectal temperature in beluga whales. In pinnipeds, eye temperature appears the best parameter for temperature control. In these animals, the average times required for temperatures to stabilise after hauling out, and the average steady-state temperature values, differed according to species: Patagonian sea lions, 10 min, 31.13 °C; harbour seals, 10 min, 32.27 °C; Pacific walruses, 5 min, 29.93 °C.

**Conclusions:** The best thermographic and most stable reference points for monitoring body temperature in marine mammals are open blowhole in cetaceans and eyes in pinnipeds.

**Keywords:** Thermography, Thermal pattern, Blowhole temperature, Eye temperature, Cetaceans, Pinnipeds

## Findings

### Background

Marine mammals have adapted to the aquatic environment after a long evolution process that started 60 million years ago [1]. Since they live partially or entirely in water, thermoregulation is a significant challenge. Entirely aquatic mammals, like cetaceans, must constantly maintain a body temperature within narrow limits in an environment where heat is conducted 25 times faster than in air [2, 3]. Amphibious mammals like pinnipeds require additional mechanisms to maintain the physiological temperature

range when they leave water. Since slight variations in body temperature may indicate body dysfunction [4], infection [5] or physiological processes like estrus and proximity to parturition [6], accurate measurements and easy body temperature monitoring are very useful in veterinary care.

Since body temperature could be measured directly in marine mammals only after death [7], radio-pills were developed which, when ingested, allow body temperature measurements in live animals [8]. However, this method is costly, affected by food ingestion, some individuals may vomit the device, and reader has to remain reasonably close to the animal to record the temperature. At present, the body temperature in live marine mammals is usually estimated from rectal readings [6, 9, 10]. Rectal temperature closely correlates with body temperature [11, 12].

\*Correspondence: mar.melero@sanidadanimal.info

<sup>1</sup> VISAVET Center, Veterinary School, Complutense University of Madrid,

Avenida Puerta de Hierro, s/n., 28040 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Melero et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



However, measuring rectal temperature in marine mammals requires special probes, training or restraining, can induce stress in animals, and requires time to obtain measurements, which mean that it is unsuitable under certain circumstances; e.g., newborns, untrained animals, or animals in the wild. Moreover, the depth at which the rectal probe enters influences the temperature reading as testes (located on both sides next to the rectum) and uterus are cooled by the vascular countercurrent heat exchanger [13–16]. In certain circumstances, taking rectal temperature might even require anaesthetising the animal because some species and individuals do not tolerate rectal temperature measurements [5], including domestic animals like dogs as only 68 % tolerate it [17]. In addition, physiological processes like digestion or peristalsis, the presence of faecal masses, and the level of muscle tone and physical activity may alter rectal temperature measurements [18].

New technologies have been developed to avoid the disadvantages of these temperature measurement methods. One is infrared thermography, in which thermal radiation at wavelengths of between 0.8 and 1.0 mm is collected and quantified from the animal to be transformed into a digital image [4]. This technique offers many advantages. It can be used at a long distance from the animal [19], it reduces handling stress and ensures technicians' safety. It can generate thermograms of many individuals in a short period of time and serves as a non-invasive diagnostic tool since it can detect variations in surface body temperature due to trauma, inflammation, infection, neurological processes, neoplasm, heat emission from internal organs or heating by external sources [10].

Infrared thermography has been applied to study many domestic species [20] and wildlife [21], including marine mammals [22–25]. Eye temperatures measured by thermography have been shown to be practically the same, or at least correlate with body temperatures in several mammal species [5, 26, 27], including human beings [28]. However, reference points on the surface of an animal that can be used reliably to estimate body temperature have not been established for most species, especially those studied mainly in the wild. This manuscript aims to apply thermography to five species of marine mammals in order to establish thermal reference points as an index of body temperature based on its easy measurement and its variance.

## Methods

Thermographic measurements were carried out in two cetacean species, namely bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and beluga whale (*Delphinapterus leucas*). Three pinniped species were also studied: Patagonian sea lion (*Otaria flavescens*), harbour seal (*Phoca vitulina*),

and Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*). The study was performed in December 2007 and April 2008 with the assistance of animal trainers.

All the animals were housed at the Oceanographic Aquarium of Valencia, and all the national and international permits were in order. No special permits were required for this research because thermograms were taken without modifying the animals' behaviour and rectal temperature measurements were performed within the Oceanographic's routine procedures.

The air and water temperature facilities were monitored twice daily. Bottlenose dolphins, harbour seals and Patagonian sea lions were housed in independent outdoor facilities where the air temperature ranged between 8.2 and 22.0 °C in December 2007 and between 18.0 and 20.0 °C in April 2008. Water temperature was maintained between 16.6 and 16.8 °C for bottlenose dolphins, between 17.6 and 18.1 °C for Patagonian sea lions and between 16.1 and 16.7 °C for harbour seals. Belugas and walruses were housed in indoor facilities located in the same building. The air temperature there was maintained between 15 and 18 °C, and the water temperature was kept between 13.5 and 15.0 °C for belugas and between 14.6 and 15.8 °C for walruses.

For cetaceans, eye and blowhole thermograms were obtained from a distance of less than 2 m while the animal was breathing voluntarily and on demand in the water. Ten adult bottlenose dolphins (two males and eight females) and two adult beluga whales (one male and one female) were imaged. During the sessions, which lasted no more than 22 and 15 min, 253 and 284 thermograms of eyes and 67 and 74 of blowholes were taken in dolphins and belugas, respectively.

For pinnipeds, the thermograms of ears, eyes, nostrils, vibrissal area, mouth and axillas were obtained. Eleven adult Patagonian sea lions (two males and nine females) and two male pups were imaged. During the sessions, which lasted no more than 18 min, 243 thermograms were taken as soon as the animals left the pool, with the camera positioned at less than 5 m from the animals. Six adult harbour seals (three males and three females) and one female cub were imaged. During the sessions, which lasted no more than 25 min, 264 thermograms were taken from a distance of less than 10 m and as soon as the animals poked their heads out of the water. Five juvenile Pacific walruses (one male and four females) were imaged. During the sessions, which lasted no more than 65 min, 388 thermograms were taken after the animals left the pool, with the camera positioned less than 5 m from the animal.

A ThermaCAM E45 Infrared Camera with a FOV25 lens (FLIR, Burlington, ON, Canada) was used for the thermographic measurements. Its thermal sensitivity is



0.1 at 25 °C. Images were analysed by the ThermoCAM QuickReport 1.0 software (FLIR), and the maximum temperatures in each area of the thermograms were calculated. Since blowholes remain open only briefly during breathing, the thermographic videos were recorded. Later in order to ensure the most accurate measurement, each video frame was analysed individually to calculate the maximum temperature inside the blowhole. Since video frames could not be evaluated with this software, only in this case, temperature measurements correspond to a little bigger area than the anatomical region evaluated. A significant relationship between dorsal fin surface temperature and water temperature have been previously determined, being the animal surface around 0.9 °C warmer than the water [25]. In this study, as expected, all temperature measurements of the surrounding skin were cooler than the interior of the blowhole, so the maximum temperature value always correspond to a point located inside it. In order to evaluate the stabilisation period of eye temperatures, thermograms were taken every 30 s after the animal left the water.

The emissivity of these animals was assumed to be 0.96, the same as water [29], and as Cuyler et al. [24] established for marine mammals given the thin film of water that covers their body surface, the tear film on their eyes or normal secretion in respiratory mucosa. The angle between the camera and the animal was taken into account because of its relevance in measurement accuracy [24, 25]. Hence, the values were divided into two groups: perpendicular, i.e., when the camera was situated perpendicularly to the animal; inclined, i.e., at angles over 30°.

In all the cetaceans, the rectal temperatures were measured at the same time as the eye and blowhole temperatures using a flexible probe thermometer with a Propaq Encore 202EL monitor (Welch Allyn, Skaneateles Falls, NY, USA). In order to perform temperature measures in a region anterior to the countercurrent heat exchanger, rectal probe was positioned at 40 cm deep to the anus in bottlenose dolphin, as Rommel et al. [14] described; and at 50–60 cm in beluga whale. To ensure temperature values were not influenced by the countercurrent heat exchanger, it was verified during the retreat of the probe that higher temperatures were not registered. Rectal temperatures in pinnipeds were measured only in three walruses and in two sea lions because the remaining animals were not trained for this purpose.

For the statistical analysis, the maximum temperatures and standard deviations of each area were calculated and the Pearson product-moment approach was followed to evaluate the correlation between the rectal temperature and the simultaneous eye and blowhole measures with the SAS 9.1.3 software (SAS Institute, Cary, NY, USA). A Kruskal–Wallis test was done to compare the

temperature of each anatomical area according to the age and gender of the animals, and the hour of the day; for this purpose, the software R, version 2.15.2, was employed (The R Foundation for Statistical Computing, 2012). For all the comparisons, a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results and discussion

Temperatures values were obtained for all the animals for almost all the thermographic areas studied, and the means, standard deviations and correlations were calculated (Table 1).

For cetaceans, the thermographs of eyes and blowholes were analysed (Table 1). Eye temperature stabilised equally rapidly (within 1 min), and a steady-state value was obtained (Table 1). The stabilisation time was shorter than in pinnipeds, probably because the anatomical and physiological differences of marine mammals' eyes as cetaceans have well-developed vascular multivessel plexuses [30, 31]. Blowhole temperature accuracy depended on where the thermal camera was positioned in relation to the animal, and also depending on whether or not the thermal data were collected during voluntary breathing or breathing on demand. The lowest standard deviation was reached at the mean maximum blowhole temperature during voluntary breathing, when thermograms were taken perpendicularly to the surface of the blowhole opening (Fig. 1). Variation in the blowhole temperature was even greater according to whether or not animals were breathing voluntarily or on demand, irrespectively of whether animals were inspiring or exhaling (Table 1).

The mean rectal temperature was  $36.75 \pm 0.369$  °C (mean  $\pm$  standard deviation) in bottlenose dolphins and  $35.68 \pm 0.184$  °C in beluga whales. The blowhole gave the highest correlation with rectal temperature when measured perpendicularly during voluntarily breathing (Table 1). The poorest correlation during breathing on demand was probably due to the shorter time that the blowhole remained open and due to its smaller aperture, which limited measurement quality.

Our results suggest that, in cetaceans, blowhole is superior to eyes as a thermal reference point during voluntary breathing, it obtain the lowest variance and the highest correlation with rectal temperature, and a temperature stabilisation period is not needed (Fig. 2). When thermograms were taken perpendicularly during voluntary breathing, the temperature was practically the same as the rectal temperature in bottlenose dolphins and was only 1 °C lower than the rectal temperature in beluga whales (Table 1).

This suggests that the thermography of blowhole opening can be a useful tool for monitoring body temperature in captive cetaceans as it is more rapid and less invasive than measuring rectal temperature. In individuals with

**Table 1 Temperature values of marine mammals measured by thermography**

	Patagonian sea lion	Harbour seal	Pacific walrus	Bottlenose dolphin	Beluga whale
Rectal	37.07 ± 0.058	–	36.22 ± 0.383	36.75 ± 0.369	35.68 ± 0.184
Ears	–	22.81 ± 6.030	–		
Eyes					
Overall	10 min 31.13 ± 1.706 0.873*	10 min 32.27 ± 0.901	5 min 29.93 ± 1.015 0.599*	1 min 32.93 ± 1.053 0.801*	1 min 32.14 ± 0.847 0.607*
Males	31.38 ± 1.518	32.89 ± 0.352	=	=	x
Females	29.56 ± 1.448	31.49 ± 0.756	=	=	x
Pups	22.29 ± 2.344	21.73 ± 1.972	x	x	x
Adults	28.55 ± 2.885	27.07 ± 5.434	x	x	x
Vibrissal area					
Overall	26.23 ± 4.220	23.54 ± 6.764	23.75 ± 3.739		
Males	27.37 ± 3.641	29.91 ± 4.779	=		
Females	24.29 ± 2.778	18.04 ± 1.757	=		
Pups	18.94 ± 1.323	18.11 ± 1.445	x		
Adults	26.20 ± 3.649	25.32 ± 6.879	x		
Mouth	–	–	30.89 ± 3.191		
Blowhole					
Voluntary					
Perpendicular				36.86 ± 0.297 0.997*	34.73 ± 0.665 0.994*
Inclined				33.5 ± 2.246	33.21 ± 1.537
On demand					
Perpendicular				33.92 ± 1.256 0.448*	31.82 ± 0.670 0.876*
Inclined				30.06 ± 2.098	28.76 ± 1.687

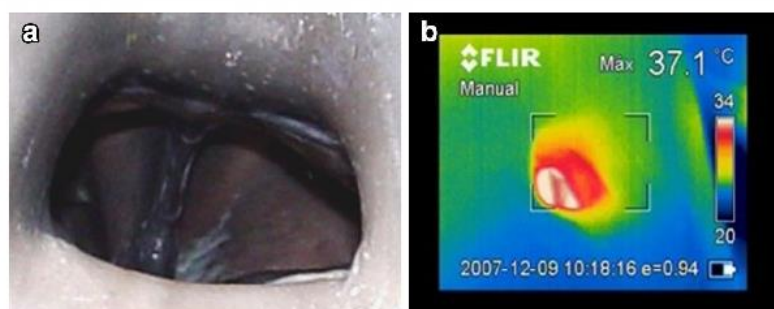
Maximum temperatures (mean ± standard deviation) of each analysed anatomical region of the five species of marine mammals, displayed in Celsius degrees (°C). [Patagonian sea lion (*Otaria flavescens*), harbour seal (*Phoca vitulina*), Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*), bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), beluga whale (*Delphinapterus leucas*)]

–: Not enough valuable thermal measurements were collected

=: Differences were found not to be significant using a Kruskal–Wallis test ( $p < 0.05$ )

x: Not enough individuals of different gender or age were studied to estimate these parameters

\* Correlation with rectal temperature

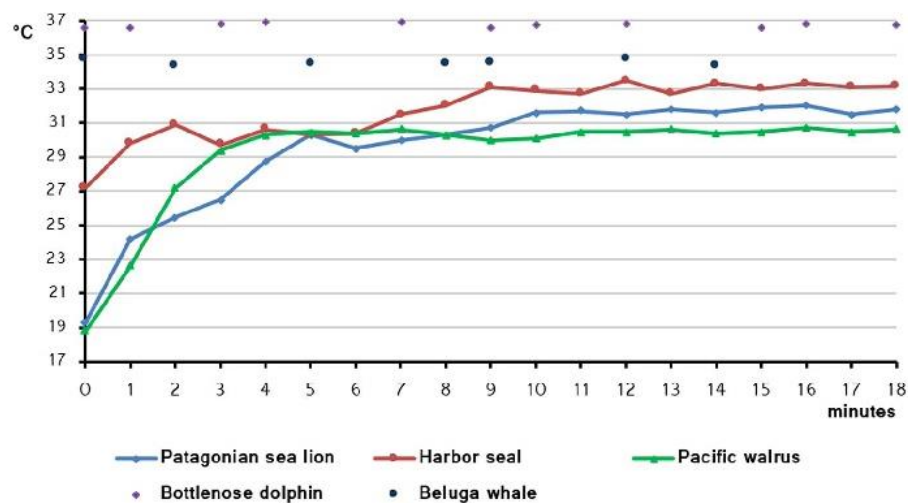


**Fig. 1** Blowhole of a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Digital (a) and thermographic (b) images of the blowhole during voluntary breathing with the thermal camera placed perpendicularly to the longitudinal axis of the dolphin

an injury or a local inflammatory process that affects the blowhole area or upper airways, eyes can be an alternative index for body temperature.

For pinnipeds, six anatomical areas were analysed by thermography. We considered that eyes were the best thermal reference point in these animals because





**Fig. 2** Pinnipeds eye temperature stabilisation and cetaceans blowhole temperature along time. Pinnipeds eye temperature for 18 min after leaving the water of one individual of each different species under study [Patagonian sea lion (*Otaria flavescens*), harbour seal (*Phoca vitulina*), Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*)]. Cetaceans blowhole temperature during voluntary breathings measured perpendicularly to the longitudinal axis of one individual of each evaluated species [Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), beluga whale (*Delphinapterus leucas*)]

eye temperature gave the lowest standard deviation (Table 1), obtained a stable value, was easy to measure and no training was needed. Eye temperature increased gradually after leaving the water to then stabilise after a period of time depending on the species (Fig. 2). Similarly, the steady-state temperature achieved depended on the species (Table 1). Some variations of eye temperature, lower than 0.8 °C, were registered after the stabilisation period. These differences were considered small, since Morgan et al. [32] established a difference of 0.6 °C between both eyes of the same individual as the upper limit for 95 % of the normal human population. The mean rectal temperature was  $37.07 \pm 0.058$  °C in Patagonian sea lions and  $36.22 \pm 0.383$  °C in Pacific walruses. Eyes gave the highest correlation with rectal temperature when measured after the temperature stabilisation period. However, as it was not possible to measure rectal temperature in harbour seals, we were unable to directly correlate eye temperature with body temperature.

For the remaining anatomical regions, we were unable to collect enough valuable measurements from nostrils and axillas to do a statistical analysis. Likewise, ear measurements and mouth values were considered only for harbour seals and Pacific walruses, respectively (Table 1). This situation came about given the difficulty to access these anatomical areas, requirement of training to maintain the correct position, or temperatures continued to be similar to the rest of the body, so it was not possible to assess statistical differences. The thermography of the vibrissal area was highly variable; this region is often

affected by the appearance of physiological thermal windows, which make accurate measurements very difficult (Table 1).

The Kruskal–Wallis test revealed statistically significant differences according to gender in Patagonian sea lions (eyes and vibrissal area temperatures), harbour seals (ears, eyes and vibrissal area temperatures) and bottlenose dolphins (blowhole during voluntary breathing). Likewise, significant differences were found in accordance with the age of Patagonian sea lions (eyes and vibrissal area temperatures) and harbour seals (ears, eyes and vibrissal area temperatures). According to these parameters, males obtained higher temperature values than females, and adults presented higher temperatures than pups. However, as all the individuals belonged to the same group, it was not possible to evaluate the effect of gender in belugas and the effect of age in walruses, dolphins and belugas. No significant differences in the reference temperatures after the stabilisation periods were found in accordance with circadian rhythm, and the air and water temperatures for any of the species examined. The robustness of this method should be tested with a larger number of animals, and with a broader range of physiologic, pathologic and ambient conditions, particularly in natural habitats.

Further studies are required to establish the equivalence between rectal and eye or blowhole temperature in a larger number of individuals, in hyper- and hypothermic animals, and also under a wider range of environmental conditions.

## Conclusions

In cetaceans, the best thermographic reference point for body temperature is the blowhole, and the thermal data should be collected when the animal is breathing voluntarily with the camera held perpendicularly to its blowhole opening. Under these conditions, the mean maximum blowhole temperature is practically the same as the rectal temperature in bottlenose dolphins and is only 1 °C lower in beluga whales. In pinnipeds, the eye can be a good thermographic reference point as an index for monitoring body temperature, but measurements should be taken only after a stabilisation period, which is characteristic for each species.

These results suggest that thermography is a reliable, immediate, remote, non-invasive tool that can prove useful for taking thermal measurements of the anatomical referent points to monitor body temperature in marine mammals. This technique is especially useful for untrained animals because previous training is not necessary, it is safe for technicians and it avoids stressing the animals.

## Abbreviations

°C: Degree celsius; min: Minutes; m: Metre; cm: Centimetre; mm: Millimetre; µm: Micrometre.

## Authors' contributions

MM, VRP and ARG collected and analysed the thermograms. DGP measured rectal temperature. DGP and JMSV coordinated and oversaw the study. MM, VRP and ARG wrote the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

## Author details

<sup>1</sup> VISAVET Center, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n., 28040 Madrid, Spain. <sup>2</sup> Veterinary Services, Oceanografic, Parques Reunidos Valencia, Ciudad de las Artes y las Ciencias, 46013 Valencia, Spain.

## Acknowledgements

We acknowledge the Oceanografic marine mammal and veterinary staff for their assistance and the Pfizer Foundation for financial support. We thank Armando Chapin Rodríguez and Helen Warbuton for helping us with the English in the manuscript, and Beatriz Martínez-López for assistance in the statistical analyses. Mar Melero is the recipient of a predoctoral fellowship from the PhD student grant program of Complutense University of Madrid and Víctor Rodríguez-Prieto is the recipient of an FPU grant from the Spanish Ministry of Education.

## Compliance with ethical guidelines

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 16 January 2014 Accepted: 24 August 2015

Published online: 04 September 2015

## References

- Williams TM, Worthy GAJ. Anatomy and physiology: the challenge of aquatic living. In: Hoelzel AR, editor. Marine mammal biology: an evolutionary approach. Oxford: Blackwell Science; 2002. p. 73–97.

- Nadel ER. Energy exchanges in water. Undersea Biomed Res. 1984;11:149–58.
- Dejours P. Water and air physical characteristics and their physiological consequences. In: Dejours P, Bolis L, Taylor CR, Weibel ER, editors. Comparative physiology: life in water and on land. Padova: Liviana Press; 1987. p. 3–11.
- Jones B. A reappraisal of the use of infrared thermal image analysis in medicine. IEEE Trans Med Imag. 1998;17(6):1019–27.
- Johnson SR, Rao S, Hussey SB, Morley PS, Traub-Dargatz JL. Thermographic eye temperature as an index to body temperature in ponies. J Equine Vet Sci. 2011;31:63–6.
- Katsumata E. Study on reproduction of captive marine mammals. J Reprod Dev. 2010;56(1):1–8.
- Morrison P. Body temperatures in some Australian mammals. III. Cetacea (Megaptera). Biol Bull. 1962;123:154–69.
- Whittow GC, Hampton IFG, Matsuura DT, Ohata CA, Smith RM, Allen JF. Body temperature of three species of whales. J Mamm. 1974;55(3):653–6.
- Geraci JR, Lounsbury VJ. Marine mammals ashore. a field guide for strandings. Galveston: A&M Sea Grant Publication; 1993.
- Walsh MT, Gaynor EV. Thermal imaging of marine mammals. In: Dierauf L, Gulland FMD, editors. CRC handbook of marine mammal medicine. 2nd edition ed. Florida: CRC Press; 2001. p. 643–52.
- Michaud A. Comparison of an infrared ear thermometer to rectal thermometers in cats. Fel Pract. 1996;24:25–30.
- Greer RJ, Cohn LA, Dodam JR, Wagner-Mann CC, Mann FA. Comparison of three methods of temperature measurement in hypothermic, euthermic, and hyperthermic dogs. J Am Vet Med Assoc. 2007;230(12):1841–8.
- Pabst DA, Rommel SA, McLellan WA, Williams TM, Rowles TK. Thermoregulation of the intra-abdominal testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during exercise. J Exp Biol. 1995;198:221–6.
- Rommel SA, Pabst DA, McLellan WA, Williams TM, Friedl WA. Temperature regulation of the testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): evidence from colonic temperatures. J Comp Physiol B. 1994;164(2):130–4.
- Rommel SA, Pabst DA, McLellan WA. Functional morphology of the vascular plexuses associated with the cetacean uterus. Anat Rec. 1993;237(4):538–46.
- Rommel SA, Pabst DA, McLellan WA, Mead JG, Potter CW. Anatomical evidence for a countercurrent heat exchanger associated with dolphin testes. Anat Rec. 1992;232(1):150–6.
- Sousa MG, Carareto R, Pereira-Junior VA, Aquino MC. Comparison between auricular and standard rectal thermometers for the measurement of body temperature in dogs. Can Vet J. 2011;52(4):403–6.
- Rexroat J, Benish K, Fraden J. Clinical accuracy of Vet-Temp™ instant ear thermometer: Comparative study with dogs and cats. [www.mimi12.com/img/Clinical\\_Accuracy.pdf](http://www.mimi12.com/img/Clinical_Accuracy.pdf).
- McCafferty DJ. The value of infrared thermography for research on mammals: previous applications and future directions. Mamm Rev. 2007;37(3):177–255.
- Yanmaz LE, Okumus Z, Dogan E. Instrumentation of thermography and its application in horses. J Anim Vet Adv. 2007;6:858–62.
- Hillsberg-Merz S. Infrared thermography in zoo and wild animals. In: Fowler ME, Miller RE, editors. Zoo and wild animal medicine, current therapy, vol. 6. Philadelphia: WB Saunders Company; 2007. p. 20–32.
- Rodríguez-Prieto V, Rubio-García A, Melero M, García D, Sánchez-Vizcaino JM. Identification of the pattern of appearance and development of thermal windows in the skin of juvenile Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*) in a controlled environment. Mar Mamm Sci. 2013;29(1):167–76.
- Mauck B, Bilgmann K, Jones DD, Eysel U, Dehnhardt G. Thermal windows on the trunk of hauled-out seals: hot spots for thermoregulatory evaporation? J Exp Biol. 2003;206:1727–38.
- Cuyler LC, Wiulsrød R, Øritsland NA. Thermal infrared radiation from free living whales. Mar Mamm Sci. 1992;8(2):120–34.
- Barbieri MM, McLellan WA, Wells RS, Blum JE, Hofmann S, Gannon J, Pabst DA. Using infrared thermography to assess seasonal trends in dorsal fin surface temperatures of free-swimming bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Sarasota Bay, Florida. Mar Mamm Sci. 2010;26(1):53–66.
- Dunbar M, Johnson SR, Rhyon JC, McCollum M. Use of infrared thermography to detect thermographic change in mule deer (*Odocoileus hemionus*) experimentally infected with foot-and-mouth disease. J Zoo Wildl Med. 2009;40:296–301.



27. Purslow C, Wolffsohn JS. The relation between physical properties of the anterior eye and ocular surface temperature. *Optom Vis Sci*. 2007;84:197–201.
28. Ng EYK, Kaw GJL. IR images and fever monitoring devices: physics, physiology, and clinical accuracy. In: Bronizino JD, editor. *Medical devices and systems, biomedical engineering handbook*. 3rd edition ed. Florida: CRC Press; 2006. p. 1–20.
29. Campbell GS, Norman JM. Radiation basics. In: Introduction An, editor. *to Environmental Biophysics*. 2nd edition ed. New York: Springer; 1998. p. 147–65.
30. Mass AM, Supin AY. Adaptive features of aquatic mammals' eye. *Anat Rec*. 2007;290:701–15.
31. Ninomiya H, Yoshida E. Functional anatomy of the ocular circulatory system: vascular corrosion casts of the cetacean eye. *Vet Ophthalmol*. 2007;10(4):231–8.
32. Morgan PB, Soh MP, Efron N. Potential applications of ocular thermography. *Optom Vis Sci*. 1993;70(7):568–76.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## OBJETIVO 2:



ESTUDIAR LA PATOLOGÍA PRODUCIDA POR  
*ERYSIPLOTHRIX Rhusiopathiae* EN  
CETÁCEOS EN LIBERTAD Y MEJORAR LAS  
HERRAMIENTAS DE DETECCIÓN DE  
ANTICUERPOS FRENTE A ESTA BACTERIA

Fuente de la imagen: [FreeImages.com/dennis spelt](https://www.freeimages.com/dennis-spelt).

## RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 2

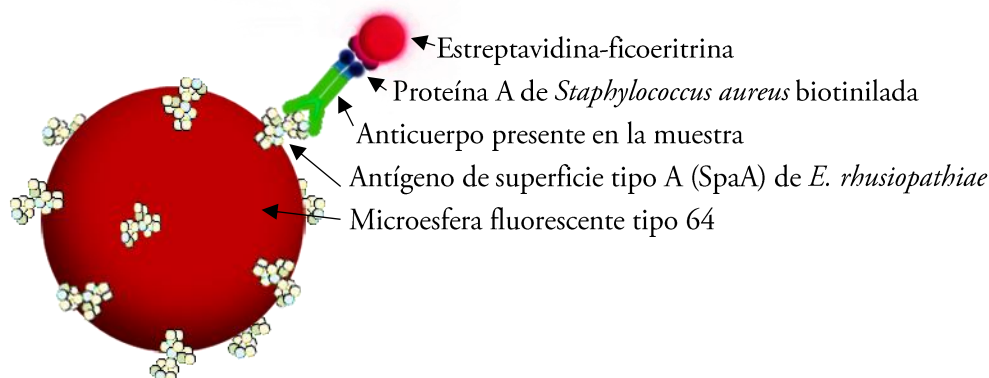
Como hemos descrito en la introducción, erisipela es una enfermedad zoonótica de gran importancia en los cetáceos, tanto libertad en como en cautividad.

En animales de vida libre, es poco frecuente, siendo el caso que se presenta en esta tesis la primera descripción de una septicemia por *Erysipelothrix rhusiopathiae* en un delfín mular varado en el Mediterráneo. Una hembra adulta varada viva en julio de 2010 que murió unos minutos después. Durante la exploración externa se observaron lesiones romboidales distribuidas por todo el cuerpo. Los resultados del análisis de sangre realizado mostraban leucocitosis (48.600 leucocitos/ $\mu$ l) caracterizada por neutrofilia (48.200 neutrófilos/ $\mu$ l), al comparar los con los rangos normales para esta especie (Bossart *et al.*, 2001), 5.600 - 12.400 leucocitos/ $\mu$ l y 2.540 - 6.140 neutrófilos/ $\mu$ l. Los principales hallazgos en la necropsia fueron congestión cerebral muy marcada; congestión pulmonar; edema y congestión en los linfonódulos cervicales y traqueobronquiales; engrosamiento y aumento de la opacidad de la pleura que presentaba aspecto rugoso y numerosas adhesiones; y hematuria. El estudio histopatológico reveló émbolos bacterianos intravasculares en piel, cerebro, pulmón y riñón. Por otra parte, a partir de muestras de piel y cerebro se aisló *E. rhusiopathiae*. Finalmente, tras la evaluación completa y exhaustiva del animal durante el varamiento, de los hallazgos de la necropsia, del estudio histopatológico y del análisis bacteriológico, se emitió un diagnóstico final de septicemia por *E. rhusiopathiae*.

En animales en cautividad, la determinación de anticuerpos frente a la bacteria es de gran interés tanto para evaluar la eficacia de las vacunas como en el estudio de la enfermedad, siendo fundamental este último punto también en los animales de vida libre.

Con este objetivo, se diseñó una técnica Luminex® para la determinación de anticuerpos frente a *E. rhusiopathiae* en cetáceos. Para ello, se acopló un polipéptido derivado del gen del antígeno de superficie tipo A (en inglés, *surface protective antigen A*, SpaA) de *E. rhusiopathiae* en las microesferas fluorescentes (Figura 9). Se utilizó un antígeno de superficie (Spa) porque su idoneidad para la determinación de anticuerpos frente a esta bacteria había sido comprobada en cerdos (Imada *et al.*, 2003; To y Nagai 2007; Giménez-Lirola *et al.*, 2012). Para validar el protocolo se emplearon muestras de suero de delfines mulares de

cautividad con y sin vacunación previa, como controles positivos y negativos respectivamente, y se valoró la evolución en la cantidad de anticuerpos a lo largo del tiempo entre revacunaciones.



**Figura 9. Esquema de la técnica Luminex® desarrollada para la detección de anticuerpos frente a *Erysipelothrix rhusiopathiae* en cetáceos.** A la microesfera fluorescente del tipo 64 se acopló un polipéptido derivado del antígeno de superficie tipo A (SpaA) de *E. rhusiopathiae*. En el caso de que la muestra de suero contenga anticuerpos frente a esta bacteria, estos se unirán al polipéptido. De ser positiva la reacción, la proteína A y la estreptavidina-ficoeritrina permitirán su determinación con el lector [Elaboración propia].

La determinación fue positiva en todos los animales vacunados. En la mayoría de los casos el nivel de fluorescencia (proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra) descendió a lo largo del tiempo entre revacunaciones. Por otra parte, todas las muestras de animales sin vacunar fueron negativas.

Además, se estudiaron muestras de suero de 15 cetáceos varados vivos en las costas de la Comunidad Valenciana entre 2006 y 2014 pertenecientes a tres especies, delfín listado, calderón gris y delfín mular. En el análisis se incluyó el caso clínico descrito previamente en este apartado, del que se estudiaron muestras de suero, líquido pericárdico y leche, ya que se trataba de una hembra en periodo de lactación. Sin embargo, no se detectaron anticuerpos frente a esta bacteria en ninguna de las muestras de este individuo. Por el contrario, se determinaron anticuerpos la muestra de suero de un calderón gris en cuya necropsia y análisis histopatológico y bacteriológico no se hallaron signos indicativos de una infección por *E. rhusiopathiae*.

### Publicaciones principales de este objetivo

Melero, M., Rubio-Guerri, C., Crespo, J.L., Arbelo, M., Vela, A.I., García-Párraga, D., Sierra, E., Domínguez, L., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2011). First case of erysipelas in a free-ranging bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) stranded in the Mediterranean Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97(2), 167-170.

Melero, M., Giménez-Lirola, L.G., Rubio-Guerri, C., Crespo-Picazo, J.L., Sierra, E., García-Párraga, D., García-Peña, F.J., Arbelo, M., Álvaro, T., Valls, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2016). Fluorescent microbead-based immunoassay for anti-*Erysipelothrix rhusiopathiae* antibody detection in cetaceans. *Diseases of Aquatic Organisms*, 117(3), 237-243.

### Aportaciones científicas relacionadas

#### ■ Ponencias

- ♦ Melero, M. (2015). Enfermedades infecciosas en cetáceos. *II Congreso de animales marinos*. Madrid.

#### ■ Congresos internacionales (comunicaciones orales)

- ♦ *44th Symposium of the European Association for Aquatic Mammals (EAAM)*. Benidorm. 2016:
  - Melero, M., Giménez-Lirola, L.G., Rubio-Guerri, C., Crespo-Picazo, J.L., Sierra, E., García-Párraga, D., García-Peña, F.J., Arbelo, M., Álvaro, T., Valls, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Development of a fluorescent microbead-based immunoassay for anti-*Erysipelothrix rhusiopathiae* antibody detection in captive and free-ranging cetaceans.
- ♦ *39th Symposium of the European Association for Aquatic Mammals (EAAM)*. Barcelona. 2011:
  - Melero, M., Rubio-Guerri, C., Crespo, J.L., Vela, A.I., Domínguez, L., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. First case of erysipelas in wild cetaceans in the Mediterranean Sea.







## NOTE

# First case of erysipelas in a free-ranging bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) stranded in the Mediterranean Sea

Mar Melero<sup>1,\*</sup>, Consuelo Rubio-Guerri<sup>1</sup>, Jose Luis Crespo<sup>1</sup>, Manuel Arbelo<sup>2</sup>, Ana Isabel Vela<sup>1</sup>, Daniel García-Párraga<sup>3</sup>, Eva Sierra<sup>2</sup>, Lucas Domínguez<sup>1</sup>, José Manuel Sánchez-Vizcaíno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Unit of Histology and Veterinary Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary School, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35416 Canary Islands, Spain

<sup>3</sup>Veterinary Department, Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias, 46023 Valencia, Spain

**ABSTRACT:** An adult female bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) stranded alive and subsequently died several minutes later on the Mediterranean coast of Spain on 14 July 2010. Clinical examination revealed foam through the blowhole and rales upon lung auscultation. On venipuncture, the blood was abnormally dense and dark. Hematological and biochemical abnormalities included dehydration, leukocytosis (48 600 leukocytes  $\mu\text{l}^{-1}$ ) characterized by neutrophilia (48 200 neutrophils  $\mu\text{l}^{-1}$ ), and elevated bilirubin (4.38 mg  $\text{dl}^{-1}$ ), alanine aminotransferase (382.3 U  $\text{l}^{-1}$ ), aspartate aminotransferase (1449.3 U  $\text{l}^{-1}$ ), lactate dehydrogenase (1631.3 U  $\text{l}^{-1}$ ), and creatine kinase (404.7 U  $\text{l}^{-1}$ ). The most relevant findings of the gross examination were rhomboid-shaped skin lesions, stable froth in the trachea, pulmonary congestion, abnormally thick and rough pleura with adhesions, edematous and congestive superficial cervical and tracheobronchial lymph nodes, red-tinged urine, and severe brain congestion. Histopathology of the kidney, lung, skin, and brain revealed multisystemic intravascular bacterial emboli. Samples of skin, brain, and lung were cultured on Columbia blood agar under both aerobic and anaerobic conditions, and pure and heavy bacterial cultures were obtained from skin and brain samples. The microorganism isolated was Gram-positive, catalase-negative, facultatively anaerobic, and rod-shaped. The isolates were identified as *Erysipelothrix rhusiopathiae* by the API Coryne biochemical system. Based on the gross and microscopic findings, a diagnosis of acute *E. rhusiopathiae* septicemia was made. To the best of our knowledge, this is the first report of *E. rhusiopathiae* septicemia in a free-ranging bottlenose dolphin.

**KEY WORDS:** *Erysipelothrix rhusiopathiae* · Septicemia · Diamond-shaped skin lesions · Bottlenose dolphin · *Tursiops truncatus*

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

## INTRODUCTION

*Erysipelothrix rhusiopathiae* is the only pathogenic species of the genus *Erysipelothrix* (Wang et al. 2010). This bacterium is a facultative anaerobe, non-spore-forming, non-acid-fast, small, Gram-positive,

rod-shaped bacillus (Brooke & Riley 1999, Wang et al. 2010). It is ubiquitous, can persist for long periods in the environment, including marine locations (Wang et al. 2010), has been isolated from the cutaneous slime of both fresh- and saltwater fish (Seibold & Neal 1956, Lauckner 1985, Kinsel et al. 1997), and

\*Email: mar.melero@sanidadanimal.info



may persist on insects, mollusks, and crustaceans (Brooke & Riley 1999, Wang et al. 2010).

*Erysipelothrix rhusiopathiae* is the causative agent of erysipelas, a disease of many mammalian and avian species, mainly swine and turkeys (Kinsel et al. 1997, Dunn et al. 2001, Wang et al. 2010). In humans, the disease caused by *E. rhusiopathiae* is known as erysipeloid to differentiate between the human streptococcal disease erysipelas (Brooke & Riley 1999). Erysipeloid is considered an occupational zoonosis caused by contact with contaminated animals, especially while handling fish, their products, their wastes, or soil (Suer & Vedros 1988, Hunt et al. 2008, Wang et al. 2010). Three forms of disease caused by *E. rhusiopathiae* infection have been described in humans: a localized cutaneous form, a generalized cutaneous form, and a septicemic form, which is associated with endocarditis (Wang et al. 2010). The dermatologic and acute septicemic forms have been reported in cetaceans: bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*, spotted dolphin *Stenella plagiodon*, long-finned pilot whale *Globicephala melas*, Indo-Pacific bottlenose dolphin *T. aduncus*, white-beaked dolphin *Lagenorhynchus albirostris*, Pacific white-sided dolphin *L. obliquidens*, beluga whale *Delphinapterus leucas*, Risso's dolphin *Grampus griseus*, killer whale *Orcinus orca*, and harbor porpoise *Phocoena phocoena* (Seibold & Neal 1956, Chastel et al. 1975, Thurman et al. 1983, Buck & Spotte 1986, Kinsel et al. 1997, Young et al. 1997, pers. comm., Boseret et al. 2002, pers. comm.). If untreated, the septicemic form often results in death in humans (Wang et al. 2010) and animals (Suer & Vedros 1988). The pathognomonic sign of erysipelas in many species is the presence of diamond-shaped skin lesions (Wang et al. 2010). In cetaceans, the lesions appear as gray, elevated rhomboid plaques with well-defined edges that occur over the entire body (Thurman et al. 1983, Suer & Vedros 1988, Kinsel et al. 1997, Dunn et al. 2001, Boseret et al. 2002, pers. comm.). Erysipelas is rarely encountered in pinnipeds and is not considered a clinical problem (Lauckner 1985, Suer & Vedros 1988, Dunn et al. 2001), whereas cetaceans are the marine mammals most susceptible to the disease (Suer & Vedros 1988, Higgins 2000).

In captive cetaceans, it has been established that the main source of infection is dead fish that have not been well preserved (Geraci et al. 1966, Lauckner 1985, Suer & Vedros 1988, Higgins 2000), but other likely sources are humans with erysipeloid, food preparation sites, opportunistic colonization of wounds, and flying insects serving as vectors between contaminated areas (Wood & Shuman 1981). For these

reasons, most cases occur in captive animals (Seibold & Neal 1956, Geraci et al. 1966, Medway & Schryver 1973, Thurman et al. 1983, Buck & Spotte 1986, Bossart & Eimstad 1988, Kinsel et al. 1997, Dunn et al. 2001). Seibold & Neal (1956) described the first case of erysipelas in captive cetaceans. More recently, Chastel et al. (1975) reported the first case in a beached pilot whale, Young et al. (1997) reported the first case in a wild killer whale, and Boseret et al. (2002) described the first case in a harbor porpoise.

## MATERIALS AND METHODS

On 14 July 2010, an adult female bottlenose dolphin stranded alive on the Mediterranean coast of Valencia (Spain). The clinical signs were froth from the blowhole and rales upon lung auscultation. A blood sample was collected by venipuncture on a vascular bundle of the tail fluke. On gross examination, the blood was abnormally dense and dark. The animal died on the beach several minutes after stranding.

The total length of the animal was 294 cm, and radiological analysis of the pectoral flipper revealed epiphyseal ossification of the growth plates of the radius and ulna bones, which correlates well with sexual maturity (García-Párraga et al. 2011). We estimated the age of the dolphin to be between 20 and 30 yr, by comparing the radiographs to others from captive animals (data not shown). The animal showed noticeable breast development and galactorrhea, suggesting that it was a lactating female.

Samples of kidney, lung, skin, and brain were preserved in formalin and processed by conventional histological techniques, sectioned at 5 µm, and stained with hematoxylin and eosin.

Skin, brain, and lung were harvested under aseptic conditions for microbiology. Tissue samples were cultured on Columbia blood agar plates (bioMérieux) and incubated for 48 h at 35°C under both aerobic and anaerobic conditions. Biochemical identification was performed using the commercial API Coryne 2.0 system (bioMérieux) according to the manufacturer's instructions. Pure and heavy bacterial cultures were obtained from skin and brain.

## RESULTS AND DISCUSSION

The blood analysis showed hematologic and biochemical abnormalities, including dehydration, leukocytosis (48 600 leukocytes µl<sup>-1</sup>) characterized by a neutrophilia (48 200 neutrophils µl<sup>-1</sup>) and elevated





Fig. 1. *Tursiops truncatus*. Rhomboid-shaped skin lesions observed during external examination

levels of bilirubin ( $4.38 \text{ mg dl}^{-1}$ ) and increased alanine aminotransferase ( $382.3 \text{ U l}^{-1}$ ), aspartate aminotransferase ( $1449.3 \text{ U l}^{-1}$ ), lactate dehydrogenase ( $1631.3 \text{ U l}^{-1}$ ), and creatine kinase ( $404.7 \text{ U l}^{-1}$ ). Compared to reported normal ranges, these values are consistent with liver damage (Bossart et al. 2001).

External examination revealed colorless, raised, 1 to 8 cm long, rhomboid-shaped skin lesions with well-defined edges along the entire body surface (Fig. 1). Additional necropsy findings included stable white froth in the trachea, pulmonary congestion, abnormally thick and rough pleura with adhesions, edematous and congestive superficial cervical and tracheobronchial lymph nodes, red-tinged, clear urine (possible hematuria), and severe brain congestion. Histopathology revealed multisystemic intravascular bacteria (Fig. 2).

The microorganism isolated from the bacterial cultures obtained from skin and brain was a Gram-positive, catalase-negative, facultatively anaerobic rod-shaped bacillus. The biochemical profile was identical to *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

The gross and microscopic findings, as well as agonal clinical chemistry and bacteriology results, were consistent with those reported for *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia in cetaceans such as captive bottlenose dolphin, spotted dolphin, Indo-Pacific bottlenose dolphin, Pacific white-sided dolphin, and Beluga whale (Seibold & Neal 1956, Geraci et al. 1966, Thurman et al. 1983, Kinsel et al. 1997).

To our knowledge, this is the first reported case of *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia in a free-ranging bottlenose dolphin.

**Acknowledgements.** This work was supported by a collaborative agreement between Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente of Valencia, the Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias of Valencia, the VISAVET Center of Com-

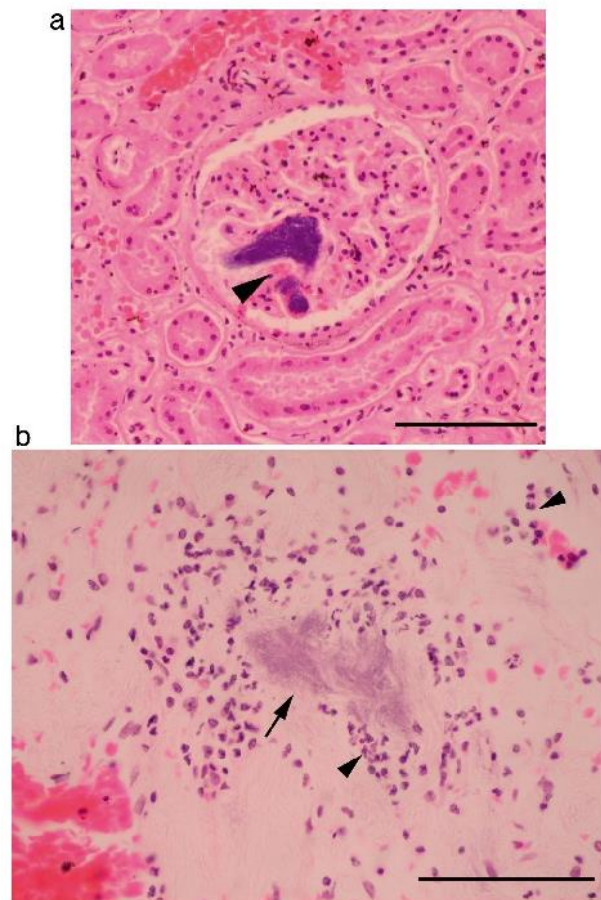


Fig. 2. *Tursiops truncatus*. (a) Histological kidney section showing intraglomerular bacterial emboli. (b) Presence of bacterial infection in connective tissue (dermis, arrow) associated with many neutrophilic cells (cellulitis, arrowheads). Hematoxylin and eosin (400 $\times$ ). Scale bars = 50  $\mu\text{m}$

plutense University of Madrid, and the Pfizer Foundation. We thank the Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, University of Valencia, for collaboration on necropsy procedures.

#### LITERATURE CITED

- Boseret G, Jauniaux T, Mainil J (2002) *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in stranded harbour porpoise and harbour seal. In: Erken AHM, Dorrenstein GM, Dollinger P (eds) Proc 2002 Eur Assoc Zoo Wildl Vet Annu Meet, Van Setten Kwadraat, Houten, p 15–17
- Bossart GD, Eimstad E (1988) *Erysipelothrix* vesicular glossitis in a killer whale (*Orcinus orca*). J Zoo Anim Med 19: 42–47
- Bossart GD, Reidarson TH, Dierauf LA, Duffield DA (2001) Clinical pathology. In: Dierauf LA, Gulland FMD (eds) Handbook of marine mammal medicine: health, disease and rehabilitation, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL, p 393–420

- Brooke CJ, Riley TV (1999) *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. J Med Microbiol 48: 789–799
- Buck JD, Spotte S (1986) Microbiology of captive white-beaked dolphins, *Lagenorhynchus albirostris*, with comments on epizootics. Zoo Biol 5:321–329
- Chastel C, Masure O, Balouet G, Laban P, Lucas A (1975) The student, the cetacean and swine-fever: a minor epidemic after dissection of a globicephale. Nouv Presse Med 4:1803–1805
- Dunn JL, Buck JD, Robeck TR (2001) Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds. In: Dierauf LA, Gulland FMD (eds) Handbook of marine mammal medicine: health, disease and rehabilitation, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL, p 312–319
- García-Párraga D, Schmitt TL, Jensen E (2011) Use of radiographic parameters for age estimation in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). In: Mazzaro L (ed) Proc 42nd Annu Conf Int Assoc Aquat Anim Med. Omnipress, Las Vegas, NV, p 110–111
- Geraci JR, Sauer RM, Medway W (1966) Erysipelas in dolphins. Am J Vet Res 27:597–606
- Higgins R (2000) Bacteria and fungi of marine mammals: a review. Can Vet J 41:105–116
- Hunt TD, Ziccardi MH, Gulland FMD, Yochem PK, Hird DW, Rowles T, Mazet JAK (2008) Health risks for marine mammal workers. Dis Aquat Org 81:81–92
- Kinsel MJ, Boehm JR, Harris B, Murnane RD (1997) Fatal *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicaemia in a captive Pacific white-sided dolphin. J Zoo Wildl Med 28: 494–497
- Lauckner G (1985) Diseases of Mammalia: Pinnipedia, Vol IV. In: Kinne O (ed) Diseases of marine animals. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, p 695–707
- Medway W, Schryver HF (1973) Respiratory problems in captive small cetaceans. J Am Vet Med Assoc 163: 571–573
- Seibold HR, Neal JE (1956) *Erysipelothrix septicaemia* in the porpoise. J Am Vet Med Assoc 1956:537–539
- Suer LD, Vedros NA (1988) *Erysipelothrix rhusiopathiae*. I. Isolation and characterization from pinnipeds and bite/abrasion wounds in humans. Dis Aquat Org 5:1–5
- Thurman GD, Downes SJ, Fothergill MB, Goodwin NM, Hegarty MM (1983) Diagnosis and successful treatment of subacute erysipelas in a captive dolphin. J S Afr Vet Assoc 54:193–200
- Wang Q, Chang BJ, Riley TV (2010) *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Vet Microbiol 140:405–417
- Wood RL, Shuman RD (1981) *Erysipelothrix* infection. In: Davis JL, Karstad LH, Trainer DO (eds) Infectious diseases of wild mammals, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames, IA, p 297–305
- Young JF, Huff DG, Ford JKB, Anthony JMG, Ellis G, Lewis RL (1997) First case report: mortality of wild resident killer whale (*Orcinus orca*) from *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In: Lewbart GA (ed) Proc 28th Annu Conf Int Assoc Aquat Anim Med. Harderwijk, p 70–74

Editorial responsibility: Michael Moore,  
Woods Hole, Massachusetts, USA

Submitted: July 4, 2011; Accepted: September 6, 2011  
Proofs received from author(s): November 12, 2011





# Fluorescent microbead-based immunoassay for anti-*Erysipelothrix rhusiopathiae* antibody detection in cetaceans

Mar Melero<sup>1,\*</sup>, Luis G. Giménez-Lirola<sup>2</sup>, Consuelo Rubio-Guerri<sup>1</sup>,  
José Luis Crespo-Picazo<sup>3</sup>, Eva Sierra<sup>4</sup>, Daniel García-Párraga<sup>3</sup>,  
Francisco Javier García-Peña<sup>5</sup>, Manuel Arbelo<sup>4</sup>, Teresa Álvaro<sup>3</sup>, Mónica Valls<sup>3</sup>,  
José Manuel Sánchez-Vizcaíno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa 50010, USA

<sup>3</sup>Veterinary Services, Oceanografic, Ciudad de las Artes y las Ciencias, 46013 Valencia, Spain

<sup>4</sup>Division of Histology and Animal Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary School, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35416 Canary Islands, Spain

<sup>5</sup>Bacteriology Department 2, Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (MAGRAMA), 28110 Algete, Madrid, Spain

**ABSTRACT:** A fluorescent microbead-based immunoassay (FMIA) for detection of anti-*Erysipelothrix rhusiopathiae* antibodies in pigs was adapted for use in cetaceans. The FMIA was validated and adjusted using serum samples from 10 vaccinated captive bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* collected between 1 and 13 mo after immunization. The technique was then used to analyze specimens from 15 free-ranging cetaceans stranded alive on the Valencian Mediterranean coast between 2006 and 2014: 11 striped dolphins *Stenella coeruleoalba*, 3 Risso's dolphins *Grampus griseus* and 1 bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. One of these wild animals was confirmed to have died from *E. rhusiopathiae* septicemia, but no anti-*E. rhusiopathiae* antibodies were detected in its serum, pericardial fluid or milk samples. Another free-ranging individual, which lacked any signs or lesions that might be indicative of *E. rhusiopathiae* infection, showed high fluorescence intensity similar to that measured in captive dolphins at 6–13 mo after vaccination. These results suggest that this animal underwent an *E. rhusiopathiae* infection several months before stranding. The findings in the present study suggest that FMIA can be useful for detecting anti-*E. rhusiopathiae* antibodies in cetaceans, and its application to free-ranging animals is particularly interesting because of the great value of these specimens. Furthermore, the FMIA can be multiplexed to allow the determination of up to 100 analytes per sample in a single well, thereby reducing the cost, time and sample volume needed.

**KEY WORDS:** *Erysipelothrix rhusiopathiae* · Erysipelas · Antibodies · Fluorescent microbead-based immunoassay · Cetaceans

## INTRODUCTION

*Erysipelothrix rhusiopathiae* is a Gram-positive, non-acid-fast, rod-shaped bacterium that is a facultative anaerobe and does not form spores (Brooke & Riley 1999, Wang et al. 2010). *E. rhusiopathiae* is ubiquitous and may persist in the environment,

including marine systems (Wang et al. 2010), for long periods in the presence of organic matter (Opriessnig & Wood 2012). It has been isolated from the cutaneous slime of both fresh- and saltwater fish, insects, mollusks and crustaceans (Seibold & Neal 1956, Lauckner 1985, Kinsel et al. 1997, Brooke & Riley 1999, Wang et al. 2010, Opriessnig et al. 2013).

\*Corresponding author: mar.melero@ucm.es

© The authors 2016. Open Access under Creative Commons by Attribution Licence. Use, distribution and reproduction are unrestricted. Authors and original publication must be credited.

Publisher: Inter-Research · www.int-res.com



*E. rhusiopathiae* is the causative agent of erysipelas, a disease that affects several species of mammals and birds, but mainly swine, turkeys (Kinsel et al. 1997, Dunn et al. 2001, Wang et al. 2010) and humans, in which *E. rhusiopathiae* infection is known as erysipeloid (Wang et al. 2010). In cetaceans, only the dermatologic and acute septicemic forms have been reported (Seibold & Neal 1956, Chastel et al. 1975, Thurman et al. 1983, Buck & Spotte 1986, Kinsel et al. 1997, Melero et al. 2011). Thrombosis of peripheral arteries and local tissue infarction cause pathognomonic rhomboid-shaped skin lesions (Sweeney & Ridgway 1975).

The main source of infection in cetaceans is ingestion of contaminated fish (Geraci et al. 1966, Lauckner 1985, Suer & Vedros 1988, Higgins 2000), but other sources can include humans with erysipeloid, contaminated food preparation sites, opportunistic colonization of wounds, and flying insects that serve as vectors of the pathogens between contaminated areas (Wood & Shuman 1981). Therefore, most cases of erysipelas in cetaceans have been reported to occur in captive animals (Seibold & Neal 1956, Geraci et al. 1966, Medway & Schryver 1973, Thurman et al. 1983, Buck & Spotte 1986, Bossart & Eimstad 1988, Kinsel et al. 1997, Dunn et al. 2001), with infections rarely reported in free-ranging cetaceans (Chastel et al. 1975, Melero et al. 2011).

Determination of antibodies against *E. rhusiopathiae* in captive cetaceans allows for the assessment of vaccine efficiency (Lacave et al. 2001, Sitt et al. 2010, Bernal-Guadarrama et al. 2014). Its determination in unvaccinated captive and in free-ranging cetaceans may also allow detection of previous exposure and may assist in diagnosis. Main surface protective antigen (Spa) proteins have been described as suitable antigens for antibody detection against *E. rhusiopathiae* in pigs (Imada et al. 2003, To & Nagai 2007, Giménez-Lirola et al. 2012). Here, we adapted a fluorescent microbead-based immunoassay (FMIA) based on a Spa protein-derived recombinant polypeptide that was specifically designed for detection of anti-*E. rhusiopathiae* antibodies in cetaceans. The FMIA was validated using samples from vaccinated captive bottlenose dolphins. It was then used to detect anti-*E. rhusiopathiae* antibodies in samples from free-ranging cetaceans stranded alive in the Mediterranean Sea, including the first case of erysipelas reported in a free-ranging bottlenose dolphin (Melero et al. 2011).

The main advantage of the FMIA is the capacity to develop multiplex diagnostic assays (Elshal & McCoy 2006) for simultaneous determination of up to 100

analytes in the same sample, thereby reducing the cost, time and sample volume needed. FMIA can be more sensitive than traditional immunoassays (van Gageldonk et al. 2008, Giménez-Lirola et al. 2012, Sánchez-Matamoros et al. 2015). Although FMIA, based on Luminex's xMAP technology, has been used successfully in veterinary disease research (Clavijo et al. 2006, Anderson et al. 2011, Wagner et al. 2011, Giménez-Lirola et al. 2012, Christopher-Hennings et al. 2013, Sánchez-Matamoros et al. 2015), the present study is, to the best of our knowledge, the first application of FMIA to cetaceans.

## MATERIALS AND METHODS

A recombinant polypeptide of 415 amino acids derived from the *E. rhusiopathiae* *spaA* gene (GenBank accession number AB019124.1) was selected and produced as an antigen for anti-*E. rhusiopathiae* antibody detection in cetaceans. This protein was previously described as a suitable antigen for anti-*E. rhusiopathiae* antibody detection in pigs (Imada et al. 2003, Ingebritson et al. 2010, Giménez-Lirola et al. 2012). The *spaA* gene fragment was commercially produced (GenScript), and the recombinant Spa protein-derived polypeptide was expressed in *Escherichia coli* by cloning into a pETDuet-1 expression vector (Novagen®). The resulting fusion protein was purified from a clarified extract of *E. coli* Rosetta BL21 (DE3) using a nickel-nitrilotriacetic acid chelate affinity chromatography kit (PrepEase® His-tagged protein purification kit, USB Corporation) according to the manufacturer's instructions. FMIA was performed as previously described in methods used for antibody detection in pigs (Giménez-Lirola et al. 2012). All incubations were carried out at room temperature (20–25°C) in the dark and under constant vortexing at 500 rpm (Fisher Scientific). During the coupling reaction, antigen was coupled to carboxylated fluorescent microbeads (25 µg antigen per 5 million beads; bead region 64) using a 2-step carbodiimide reaction as previously described for pigs (Staros et al. 1986).

For the FMIA, serum samples were diluted 1:25 in assay buffer (0.1 M phosphate-buffered saline [PBS], 10% goat serum [Gibco®, Life Technologies], 0.05% Tween-20, pH 7.2) and mixed with 50 µl of the suspension of antigen-coupled beads into each well of a 96-well flat bottom microtiter plate (Bio-Plex Pro™, Bio-Rad Laboratories). Plates were incubated for 60 min and washed 3 times with 0.1 M PBS containing 0.05% Tween-20 (PBST). Subsequently, 50 µl of biotinylated Protein A from *Staphylococcus aureus*



(Sigma-Aldrich) diluted 1:100 in assay buffer was added to each well, and the plates were incubated for another 30 min. After 3 washes with PBST, 50  $\mu$ l of streptavidin-R-phycoerythrin (Sigma-Aldrich), diluted to 2.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> in assay buffer, was added to each well and the plates were incubated for 30 min. After an additional wash step, the beads were resuspended in 100  $\mu$ l of assay buffer and the reporter fluorescence of the beads was determined using a dual-laser Bio-Plex® 200 instrument (Bio-Rad) and analyzed using Bio-Plex Manager 6.0 software (Bio-Rad).

Median fluorescence intensity (MFI) was estimated from at least 50 beads; samples were evaluated in triplicate and the result was taken as the average of the 3 measurements. To assay levels of non-specific binding, we included on each plate 3 'background wells' consisting of coupled microspheres incubated with serum diluent in the absence of sample. The MFI response was corrected by subtracting the background well signal (the mean of the 3 wells) from the signal obtained for each sample.

The Spa-based FMIA was validated for cetaceans with serum samples from 10 captive bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* vaccinated with *Erysipelothrix*-based inactivated vaccines, originally designed for use in pigs. Animals were housed at Oceanogràfic (Valencia, Spain) where a 12-mo booster schedule is followed. Serum samples were collected at intervals of 1, 2, 6, 12, and 13 mo after annual revaccination (or after the primo-vaccination, in the case of 2 individuals). All dolphins were vaccinated with ER BAC PLUS (Pfizer), with the exception of 1 individual that was vaccinated with ERYVAC (Intervet UK). For negative controls, serum samples from 20 unvaccinated captive bottlenose dolphins were also analyzed. Additionally, serial decimal dilutions of positive samples were tested.

After validation with samples of vaccinated animals, the FMIA was used to analyze serum samples from 15 free-ranging cetaceans which live-stranded (and later died) on the Mediterranean coast of Valencia Community (Spain). These specimens came from 11 striped dolphins *Stenella coeruleoalba*, 3 Risso's dolphins *Grampus griseus*, and the first case of erysipelas reported in a free-ranging bottlenose dolphin *T. truncatus*, stranded in the Mediterranean Sea (Melero et al. 2011).

Necropsy, histopathology, virology and bacteriology analysis were performed on all 15 free-ranging cetaceans. However, descriptive case evaluation included only the bottlenose dolphin and one Risso's dolphin that tested positive for anti-*E. rhusiopathiae* antibodies. Necropsies were performed following the

standard protocols of the European Cetacean Society (Kuiken & García-Hartmann 1991). Three sets of samples were prepared: one set was preserved in transport medium for bacteriological assays, a second set was stored at -20°C for virological assays, and the third was preserved in formalin for histopathology examination.

For bacteriological analysis, swabs were collected from the mouth, blowhole, liver, spleen, lung, kidney and several sections of intestine from 4 striped dolphins and 2 Risso's dolphins; swabs were also collected from the cardiac valves of one Risso's dolphin. Each swab was preserved in 1 cryotube with FBP medium (see Gorman & Adley 2004) containing 0.5 % active charcoal (Sigma-Aldrich), and the tubes were frozen at -20°C until analysis. Samples processed for aerobic culture were inoculated onto Columbia agar with 5 % sheep blood (CBA; Oxoid) and MacConkey agar plates (Oxoid), and then incubated overnight at 35°C. For anaerobic culture, swabs were inoculated onto CBA and tryptose sulphite cycloserine agar plates (Oxoid) and incubated overnight at 35°C in anaerobic jars using the AnaeroGen system (Oxoid). Intestinal swabs were further analyzed using protocols based on ISO 10272-1:2006 (ISO 2006a,b) to detect *Campylobacter* and protocols based on ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (ISO 2007) to detect *Salmonella*. Finally, swabs collected from liver, spleen, lung, and kidney were inoculated into 5 ml of brain heart infusion (BHI) broth medium (Difco Laboratories) containing 0.1 % Tween 80, 5 % horse serum, 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> gentamicin, 0.1 % sodium azide, and 0.001 % crystal violet. After incubation at 37°C for 24 h, 1 loopful of broth culture was streaked onto BHI agar containing 0.1 % Tween 80, 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> gentamicin, and 0.1 % sodium azide. The agar plates were incubated at 37°C for 48 h in an atmosphere of 5–10 % CO<sub>2</sub> and then examined for the presence of typical *Erysipelothrix* colonies (Hassanein et al. 2001). All isolates considered significant after culture were further characterized using standard diagnostic techniques, including the API 20E, API 20NE, and API 20STREP systems (BioMérieux) and PCR-based analysis of 16S rRNA gene sequences when necessary. Bacteriology analysis of specimens from the bottlenose dolphin was previously described in Melero et al. (2011).

Morbillivirus can have immunosuppressive effects (Domingo et al. 1992, Schulman et al. 1997, Heaney et al. 2002). In order to examine whether infection with this virus could affect anti-*E. rhusiopathiae* antibody production, total RNA was extracted from skin, brain, lung, kidney, tonsil, prescapular and pulmonary lymph node tissues of all 15 free-ranging cetaceans



using the NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel). Cetacean morbillivirus (CeMV) diagnosis was performed using a real time RT-PCR assay as previously described (Rubio-Guerri et al. 2013).

During necropsy, tissues of all major organs and lesions were collected and stored in a fixative solution of 10% neutral buffered formalin for histological analysis. Fixed tissue samples were trimmed, processed by routine methods, embedded in paraffin, sectioned to a thickness of 5  $\mu$ m, and stained with hematoxylin and eosin for examination by light microscopy.

## RESULTS AND DISCUSSION

The presence of anti-*Erysipelothrix rhusiopathiae* antibodies in serum samples from all vaccinated dolphins was confirmed by Spa-based FMIA (Table 1). MFI values varied between individuals and decreased in most animals (except for Dolphins 5, 8, and 10) over time after vaccination (Table 1). No differences in MFI were related to the time of sample collection (after primo-vaccination or annual booster) (Table 1). Dolphin 2 displayed high MFI values only at 1 and 2 mo after vaccination, and Dolphin 1 presented the highest MFI values of all evaluated animals (except for Dolphin 6 at 12 mo after vaccination). However, a larger number of primo-vaccinated animals should be evaluated to establish the relationship between MFI value and the number of previous immunizations.

MFI values in negative controls were between -97.25 and 117.75 (mean = -54.89). Serial decimal dilutions showed that most positive samples could be diluted 100 times before becoming negative, while serum samples with MFI values near 1000 could not be diluted (Fig. 1).

Among free-ranging cetaceans, only 1 individual Risso's dolphin *Grampus griseus* (i.e. 6.7% of dolphins sampled) showed positive levels of anti-*E. rhusiopathiae* antibodies by Spa-based FMIA (Table 2).

The bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* that died from an *E. rhusiopathiae* septicemia (Melero et al. 2011) tested negative for anti-*E. rhusiopathiae* antibodies in its serum, pericardial fluid, and milk specimens. Rhomboid-shaped skin lesions, which are a pathognomonic sign of erysipelas in many species (Wang et al. 2010), were observed in this animal (Fig. 2). In addition, *E. rhusiopathiae* was successfully cultured and isolated from skin and brain samples. Blood analysis revealed leukocytosis (48 600 leukocytes  $\mu$ l<sup>-1</sup>) characterized by a neutrophilia

Table 1. Median fluorescence intensity (MFI) of serum from 10 vaccinated bottlenose dolphins sampled at different times after annual revaccination. Dolphin 1 was vaccinated with ERYVAC (Intervet), and Dolphins 2–10 with ER BAC PLUS (Pfizer). For Dolphins 1 and 2, time after vaccination was counted after receiving the booster dose at 21 d. MFI values in **bold** are lower than the MFI value obtained from the free-ranging Risso's dolphin with a positive MFI value (shown in Table 2)

ID	Months after vaccination				
	1	2	6	12	13
1	9671.21	8373.75	8321.75	4356.50	
2	4968.67	2398.75	<b>113.75</b>	<b>36.00</b>	<b>-64.00</b>
3		6819.67	3078.00	<b>313.50</b>	
4	4710.17	<b>974.67</b>	<b>788.25</b>	<b>399.25</b>	
5	2471.50		3079.17	2454.75	
6	6827.17		5389.00	4746.25	
7		5277.50	1830.00	<b>780.00</b>	<b>387.75</b>
8		3982.67	1934.00	2867.00	
9	2979.50	3001.00	2339.50	<b>1457.33</b>	
10		<b>1273.50</b>	<b>1251.25</b>	<b>1508.00</b>	

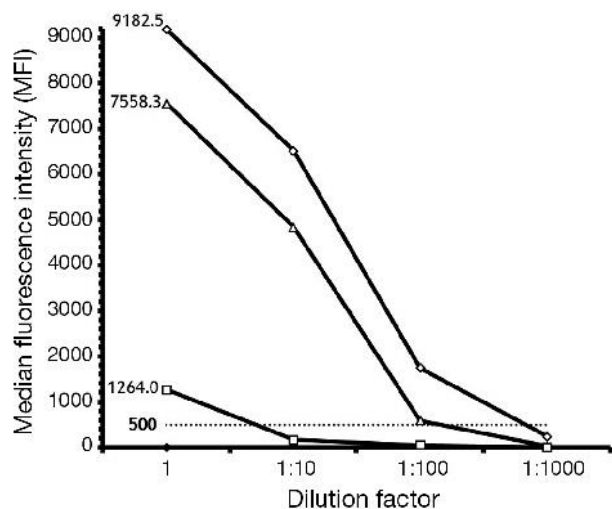


Fig. 1. Median fluorescence intensity (MFI) values of serial decimal dilutions from 3 serum samples taken from vaccinated bottlenose dolphins

(48 200 neutrophils  $\mu$ l<sup>-1</sup>), based on reported normal ranges in healthy animals of 5600–12 400 leukocytes  $\mu$ l<sup>-1</sup> and 2540–6140 neutrophils  $\mu$ l<sup>-1</sup> (Bossart et al. 2001). The test for CeMV was negative. Histopathological analysis revealed erysipelas-like lesions consisting of multisystemic intravascular bacteria and mild suppurative inflammatory reaction in affected tissues. Based on external examination, bacteriology and histopathology findings, a final diagnosis of acute *E. rhusiopathiae* septicemia was made (Melero et al. 2011). *E. rhusiopathiae* infection can progress rapidly in immunocompromised individuals

Table 2. Median fluorescence intensity (MFI) of samples from 15 free-ranging cetaceans stranded alive in the Mediterranean Sea between 2006 and 2014. Free-ranging Risso's dolphin *Grampus griseus* with a positive MFI value shown in **bold** (see 'Results and Discussion' section). The *Tursiops truncatus* specimen died from acute *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia

Individual ID	Tissue	MFI
<b><i>Tursiops truncatus</i></b>		
Tt14.07.2010	Serum	-110.75
	Pericardial fluid	-113.75
	Milk	-107.50
<b><i>Grampus griseus</i></b>		
Gg25.04.2006	Serum	-58.50
<b>Gg11.12.2011</b>	<b>Serum</b>	<b>1649.75</b>
Gg29.03.2013	Serum	-57.50
<b><i>Stenella coeruleoalba</i></b>		
Sc09.07.2007 neonate	Serum	-21.25
Sc09.07.2007 adult	Serum	-11.75
Sc15.07.2007	Serum	-13.25
Sc12.07.2007	Serum	-12.25
Sc18.07.2007	Serum	-14.25
Sc25.08.2007	Serum	-19.75
Sc25.03.2011	Serum	-118.50
Sc04.12.2012	Serum	-133.25
Sc13.02.2013	Serum	180.75
Sc12.05.2013	Serum	-49.00
Sc09.02.2014	Serum	-107.00



Fig. 2. Rhomboid-shaped skin lesions observed during an external examination of a bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* stranded alive in the Mediterranean Sea

from other species (Sawada et al. 1987, Foster et al. 2012, Sinclair et al. 2013). In the present adult female dolphin, however, immunosuppression seems unlikely based on the marked neutrophilia and negative CeMV diagnosis. Therefore, we hypothesize that one explanation for the absence of anti-*E. rhusiopathiae* antibodies could be the possibility that the septicemia progressed too quickly to allow the animal to mount a specific antibody response.

From the 15 free ranging cetaceans evaluated for the presence of anti-*E. rhusiopathiae* antibodies, only

1 of the 3 Risso's dolphins was identified as seropositive according to Spa-based FMIA (MFI = 1649.75) (Table 2). This MFI value was markedly higher than the MFI values obtained for the other 2 free ranging Risso's dolphins evaluated in this study (Table 2). Although this animal belongs to a different species than the vaccinated cetaceans, the MFI obtained was similar to the values obtained for the vaccinated animals evaluated at 6 mo after immunization (when 30 % of vaccinated animals showed lower MFI value than the Risso's dolphin) and at 12 mo after immunization (when 60 % of vaccinated animals showed lower MFI value) (Table 1). Detailed comparison of the MFI value from the free-ranging Risso's dolphin with the mean MFI values from vaccinated dolphins at each time point after immunization shows that the value for the free-ranging animal fell between those for the vaccinated dolphins at 12 mo (mean MFI = 1891.86) and at 13 mo (mean MFI = 161.88) (Fig. 3).

The seropositive free-ranging Risso's dolphin that was stranded alive in December 2011 was an adult male. External examination of the stranded dolphin revealed poor body condition, a moderate amount of external parasites, and the presence of secretion and parasites in the pterygoid sinuses and the tympanic area, which may have made echolocation difficult. Thus, the ability of the animal to feed effectively may have been compromised, potentially leading to it becoming weak. Nevertheless, the final cause of stranding remains unclear. This animal tested negative for CeMV, and histopathological analysis revealed no microscopic lesions compatible with *E. rhusiopathiae* infection in any tissues examined. Bacteriology analysis revealed negative results for *E. rhusiopathiae*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in this animal, as well as in the other free-ranging cetaceans evaluated.

*Stenotrophomonas maltophilia* was isolated from the cardiac valves of the seropositive Risso's dolphin. *Streptococcus* sp. and *Staphylococcus* sp. were isolated from mouth swabs of many of the free-ranging cetaceans, and bacterial species *Clostridium perfringens*, *E. coli*, and *Enterobacter aerogenes* were frequently isolated from intestinal samples.

The MFI value obtained from the wild Risso's dolphin (1649.75), when compared to the values obtained during several months post vaccination in 10 vaccinated bottlenose dolphins, may suggest that the Risso's dolphin was previously in contact with *E. rhusiopathiae*, though, based on the bacteriology and histopathology results, it seemed unlikely that the animal was undergoing the disease at the time of death.



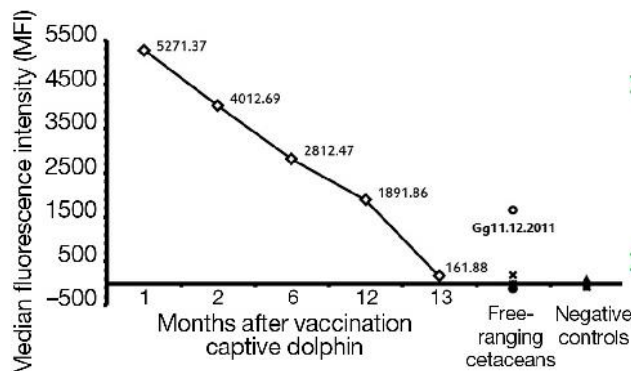


Fig. 3. Average of median fluorescence intensity (MFI) values of serum samples taken from vaccinated bottlenose dolphins at different times after annual revaccination (n = 10), free-ranging cetaceans stranded alive in the Mediterranean Sea between 2006 and 2014 (n = 15), and unvaccinated bottlenose dolphins (negative controls) (n = 20). MFI value of 1649.75 from 1 free-ranging Risso's dolphin is labeled with its individual identifier (Gg11.12.2011)

## CONCLUSIONS

The present study validates a fluorescent microbead-based immunoassay, based on *E. rhusiopathiae* Spa protein, to detect antibodies against the pathogen in cetaceans. The assay was validated in serum samples from vaccinated bottlenose dolphins, and then used successfully to assay samples from 3 species of free-ranging cetaceans: striped dolphin, Risso's dolphin and bottlenose dolphin.

FMIA can be a useful tool for vaccine efficiency assessment. This technique may be particularly valuable for studying diseases in cetaceans not only because it can be applied to free-ranging animals, but also because it allows for multiplexing. Up to 100 analytes in the same sample can be simultaneously determined, reducing the time, costs and sample volume required. This makes FMIA well suited to studies of wild dolphins, where sample collection is difficult, specimens have a great value, and where rapid, reliable diagnosis is essential.

**Acknowledgements.** The authors thank the entire Dolphinarium Team at the Oceanographic of the Ciudad de las Artes y las Ciencias (Valencia) for their exceptional work. This study was supported by a collaborative agreement involving the Conselleria d' Infraestructures, Territori i Medi Ambient of the Valencian Community, the Oceanographic, the VISAVET Center of Complutense University of Madrid, and the Pfizer Foundation. M.M. is the recipient of a predoctoral fellowship from the PhD student grant program of Complutense University of Madrid. C.R.G. is the recipient of a predoctoral fellowship from the FPU program of the Spanish Ministry of Education.

## LITERATURE CITED

- Anderson S, Wakeley P, Wibberley G, Webster K, Sawyer J (2011) Development and evaluation of a Luminex multiplex serology assay to detect antibodies to bovine herpes virus 1, parainfluenza 3 virus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus, with comparison to existing ELISA detection methods. *J Immunol Methods* 366:79–88
- Bernal-Guadarrama MJ, García-Parraga D, Fernández-Gallardo N, Zamora-Padrón R and others (2014) Development of an indirect immunofluorescence technique for the evaluation of generated antibody titers against *Erysipelothrix rhusiopathiae* in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Arch Microbiol* 196:785–790
- Bossart GD, Eimstad E (1988) *Erysipelothrix vesicularis* in a killer whale (*Orcinus orca*). *J Zoo Anim Med* 19: 42–47
- Bossart GD, Reidarson TH, Dierauf LA, Duffield DA (2001) Clinical pathology. In: Dierauf LA, Gulland FMD (eds) *Handbook of marine mammal medicine: health, disease and rehabilitation*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL, p 393–420
- Brooke CJ, Riley TV (1999) *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J Med Microbiol* 48:789–799
- Buck JD, Spotte S (1986) Microbiology of captive white-beaked dolphins, *Lagenorhynchus albirostris*, with comments on epizootics. *Zoo Biol* 5:321–329
- Chastel C, Masure O, Balouet G, Laban P, Lucas A (1975) The student, the cetacean and swine-fever. A minor epidemic after dissection of a globicephale. *Nouv Presse Med* 4:1803–1805
- Christopher-Hennings J, Araujo KP, Souza CJ, Fang Y and others (2013) Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* 25:671–691
- Clavijo A, Hole K, Li M, Collignon B (2006) Simultaneous detection of antibodies to foot-and-mouth disease non-structural proteins 3ABC, 3D, 3A and 3B by a multiplexed Luminex assay to differentiate infected from vaccinated cattle. *Vaccine* 24:1693–1704
- Domingo M, Visa J, Pumarola M, Marco AJ, Ferrer L, Rabanal R, Kennedy S (1992) Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Pathol* 29:1–10
- Dunn JL, Buck JD, Robeck TR (2001) Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds. In: Dierauf LA, Gulland FMD (eds) *Handbook of marine mammal medicine: health, disease and rehabilitation*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL, p 312–319
- Elshal MF, McCoy JP (2006) Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods* 38:317–323
- Foster JD, Hartmann FA, Moriello KA (2012) A case of apparent canine erysipelas associated with *Erysipelothrix rhusiopathiae* bacteraemia. *Vet Dermatol* 23:528–530
- Geraci JR, Sauer RM, Medway W (1966) Erysipelas in dolphins. *Am J Vet Res* 27:597–606
- Giménez-Lirola LG, Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T (2012) Development of a novel fluorescent microbead-based immunoassay and comparison with three enzyme-linked immunoassays for detection of anti-*Erysipelothrix* spp. IgG antibodies in pigs with known and unknown exposure. *J Microbiol Methods* 91:73–79



- Gorman R, Adley CC (2004) An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-85^{\circ}\text{C}$  for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. Lett Appl Microbiol 38:306–310
- Hassanein R, Sawada T, Kataoka Y, Itoh K, Suzuki Y (2001) Serovars of *Erysipelothrix* species isolated from the tonsils of healthy cattle in Japan. Vet Microbiol 82:97–100
- Heaney J, Barrett T, Cosby SL (2002) Inhibition of *in vitro* leukocyte proliferation by morbilliviruses. J Virol 76: 3579–3584
- Higgins R (2000) Bacteria and fungi of marine mammals: a review. Can Vet J 41:105–116
- Imada Y, Mori Y, Daizoh M, Kudoh K, Sakano T (2003) Enzyme-linked immunosorbent assay employing a recombinant antigen for detection of protective antibody against swine erysipelas. J Clin Microbiol 41:5015–5021
- Ingebritson AL, Roth JA, Hauer PJ (2010) *Erysipelothrix rhusiopathiae*: association of Spa-type with serotype and role in protective immunity. Vaccine 28:2490–2496
- ISO (International Organization for Standardization) (2006a) ISO 10272-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp.—Part 1: Detection method. ISO, Geneva
- ISO (International Organization for Standardization) (2006b) ISO/TS 10272-2:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp.—Part 2: Colony count technique. ISO, Geneva
- ISO (International Organization for Standardization) (2007) ISO 6579:2002/Amd 1:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. ISO, Geneva
- Kinsel MJ, Boehm JR, Harris B, Murnane RD (1997) Fatal *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicaemia in a captive Pacific white-sided dolphin. J Zoo Wildl Med 28:494–497
- Kuiken T, García-Hartmann M (1991) Dissection techniques and tissue sampling. Proc 1st ECS Workshop on Cetacean Pathology: dissection techniques and tissue sampling, Leiden, Netherlands, 13–14 September 1991. European Cetacean Society Newsletter Spec Issue 17, European Cetacean Society, p 1–39
- Lacave G, Cox E, Hermans J, Devriese L, Goddeeris BM (2001) Induction of cross-protection in mice against dolphin *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates with a swine commercial vaccine. Vet Microbiol 80:247–253
- Lauckner G (1985) Diseases of Mammalia: Pinnipedia. In: Kinne O (ed) Diseases of marine animals, Vol 4, Part II. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, p 695–707
- Medway W, Schryver HF (1973) Respiratory problems in captive small cetaceans. J Am Vet Med Assoc 163: 571–573
- Melero M, Rubio-Guerri C, Crespo JL, Arbelo M and others (2011) First case of erysipelas in a free-ranging bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) stranded in the Mediterranean Sea. Dis Aquat Org 97:167–170
- Opriessnig T, Wood RL (2012) Erysipelas. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed) Diseases of swine, 10th edn. Wiley-Blackwell, Oxford, p 750–759
- Opriessnig T, Shen HG, Bender JS, Boehm JR, Halbur PG (2013) *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates recovered from fish, a harbour seal (*Phoca vitulina*) and the marine environment are capable of inducing characteristic cutaneous lesions in pigs. J Comp Pathol 148:365–372
- Rubio-Guerri C, Melero M, Rivera-Arroyo B, Bellière EN and others (2013) Simultaneous diagnosis of Cetacean morbillivirus infection in dolphins stranded in the Spanish Mediterranean sea in 2011 using a novel Universal Probe Library (UPL) RT-PCR assay. Vet Microbiol 165:109–114
- Sánchez-Matamoros A, Beck C, Kukiela D, Lecollinet S and others (2015) Development of a microsphere-based immunoassay for serological detection of African horse sickness virus and comparison with other diagnostic techniques. Transbound Emerg Dis (in press) doi: 10.1111/tbed.12340
- Sawada T, Tamura Y, Takahashi T (1987) Effect of cyclophosphamide and carrageenan on resistance of mice to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Vet Microbiol 15:341–346
- Schulman FY, Lipscomb TP, Moffett D, Krafft AE and others (1997) Histologic, immunohistochemical, and polymerase chain reaction studies of bottlenose dolphins from the 1987–1988 United States Atlantic Coast Epizootic. Vet Pathol 34:288–295
- Seibold HR, Neal JE (1956) *Erysipelothrix* septicaemia in the porpoise. J Am Vet Med Assoc 128:537–539
- Sinclair M, Hawkins A, Testro A (2013) Something fishy: an unusual *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in an immunocompromised individual. BMJ Case Rep. doi: 10.1136/bcr-2013-008873
- Sitt T, Bowen L, Blanchard MT, Gershwin LJ and others (2010) Cellular immune responses in cetaceans immunized with a porcine erysipelas vaccine. Vet Immunol Immunopathol 137:181–189
- Staros JV, Wright RW, Swingle DM (1986) Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Anal Biochem 156: 220–222
- Suer LD, Vedros NA (1988) *Erysipelothrix rhusiopathiae*. I. Isolation and characterization from pinnipeds and bite/abrasion wounds in humans. Dis Aquat Org 5:1–5
- Sweeney JC, Ridgway SH (1975) Common diseases of small cetaceans. J Am Vet Med Assoc 167:533–540
- Thurman GD, Downes SJ, Fothergill MB, Goodwin NM, Hegarty MM (1983) Diagnosis and successful treatment of subacute erysipelas in a captive dolphin. J S Afr Vet Assoc 54:193–200
- To H, Nagai S (2007) Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Clin Vaccine Immunol 14:813–820
- van Gageldonk PG, van Schaijk FG, van der Klis FR, Berbers GA (2008) Development and validation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of serum antibodies to *Bordetella pertussis*, diphtheria and tetanus. J Immunol Methods 335:79–89
- Wagner B, Freer H, Rollins A, Erb HN, Lu Z, Grohn Y (2011) Development of a multiplex assay for the detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses and its validation using Bayesian and conventional statistical methods. Vet Immunol Immunopathol 144:374–381
- Wang Q, Chang BJ, Riley TV (2010) *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Vet Microbiol 140:405–417
- Wood RL, Shuman RD (1981) *Erysipelothrix* infection. In: Davis JL, Karstad LH, Trainer DO (eds) Infectious diseases of wild mammals, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames, IA, p 297–305



### OBJETIVO 3:



ANALIZAR LA PRESENCIA DE DIFERENTES  
VIRUS EN MAMÍFEROS MARINOS DE  
CAUTIVIDAD Y DE VIDA LIBRE

Fuente de la imagen: [FreeImages.com/Lyndon Smith](https://www.freeimages.com/photo/1144444).



## RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 3

El estudio de los virus que afectan a los mamíferos tiene un gran interés como se expone en la introducción. Sin embargo, como hemos visto, muchas de las publicaciones se refieren a casos clínicos o visualización de lesiones sin identificación del agente etiológico.

Como posibles indicadores de la salud de las poblaciones de mamíferos marinos, durante la realización de esta tesis doctoral estudiamos las infecciones por herpesvirus y poxvirus en mamíferos marinos de vida libre y mantenidos en cautividad.

En este apartado exponemos los casos de la primera determinación de herpesvirus en miembros de los géneros *Odobenus* y *Balaenoptera*. Además, en el primer caso se determinó poxvirus, también por primera vez en dicho género.

Tras el fallecimiento de una morsa del Pacífico adulta del Oceanogràfic de Valencia, se procedió a la realización de la necropsia completa y de análisis virológicos, histopatológicos y bacteriológicos. Se amplificó ADN y ARN con una secuencia de gammaherpesvirus a partir de una muestra de tonsila faríngea, indicando que se estaba produciendo replicación viral. Microscópicamente, en este tejido se observaron lesiones compatibles con las producidas por este virus. En este caso, la secuencia obtenida era diferente a las reportadas anteriormente y las secuencias más similares habían sido amplificadas a partir de muestras de otros pinnípedos y carnívoros emparentados. Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune que pudiera haber estimulado la presencia de herpesvirus en esta morsa y en las otras cuatro con las que compartía instalación, se estudió mediante un ELISA directo la presencia de inmunoglobulinas G (IgG) y M (IgM) frente a herpesvirus canino. Se evaluaron muestras de suero recogidas dos, seis y 15 meses antes de la muerte del caso clínico, excepto en el caso de uno de los ejemplares que falleció previamente, en el que la muestra analizada databa de 20 meses antes de la muerte del caso clínico. Todos los sueros fueron negativos a la presencia de IgG e IgM frente a herpesvirus canino, excepto todas las muestras del caso clínico, que presentaron IgMs. Además, en de muestras de piel, ganglios linfáticos prescapular y traqueobronquial y tonsila se determinó la presencia de poxvirus, observándose además cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en la mucosa de la tonsila. La secuencia amplificada era muy similar a aquella registrada como *cetaceanpoxvirus 1*. Este hecho nos hizo sospechar

que el origen de la infección pudiese estar en los ejemplares de beluga con los que las morsas comparten edificio. No existe posibilidad de contacto directo entre los animales y aunque las piscinas se encuentran muy próximas, los sistemas de agua son independientes. Sin embargo, los entrenadores son comunes y podrían haber actuado como vectores mecánicos. Por ello, se evaluó la presencia de poxvirus en muestras de sangre y de piel con y sin lesiones de las belugas y en hisopos orales de los entrenadores, obteniendo un resultado negativo en todas las muestras analizadas.

Por otra parte, dos ejemplares pertenecientes al género *Balaenoptera* vararon muertos en la Comunidad Valenciana. Tras la obtención de muestras, se amplificó alphaherpesvirus en muestras de piel y mucosa peneana de un rorcual común (*Balaenoptera physalus*) juvenil; y gammaherpesvirus a partir de muestras de piel, músculo y sistema nervioso central de una cría de rorcual aliblanco (*Balaenoptera acutorostrata*). Las tres secuencias de herpesvirus obtenidas eran diferentes a todas las depositadas anteriormente en las bases de datos de acceso público, siendo las más parecidas las secuencias de herpesvirus amplificados a partir de muestras de otras especies de cetáceos. El avanzado estado de descomposición no permitió el análisis histológico de las muestras ni la valoración del estado de replicación viral o latencia de herpesvirus mediante a la detección de ARN con la secuencia del virus.

Para entender mejor la relación de herpesvirus con los cetáceos se determinó sistemáticamente la presencia de ADN y ARN con la secuencia de la ADN polimerasa de herpesvirus en todos los tejidos muestreados de los cetáceos varados en la Comunidad Valenciana entre junio de 2010 y junio de 2013 de cuatro especies diferentes (delfín listado, delfín mular, calderón gris y zifio de Cuvier). La PCR utilizada para la determinación fue la diseñada por vanDevanter *et al.* (1996). Es importante tener en cuenta que herpesvirus tiene la capacidad de establecer infecciones latentes que pueden revertir a infecciones con replicación viral por causas como el estrés y la inmunosupresión. Por ello, es fundamental estudiar la prevalencia y la presencia de ARN de este virus que nos indique si se está produciendo replicación viral. Para comprobar que la falta de detección de ARN no se debía al estado de las muestras, sólo se utilizaron en el estudio del estado de la infección aquellas que fueron positivas en la determinación de ARN con la secuencia del gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (en inglés, *glyceraldehyde-3-phosphate*

*dehydrogenase*, GAPDH). Para la determinación de GAPDH se utilizó la PCR diseñada por Gröne *et al.* (1996).

La prevalencia obtenida fue de 80,85% (38/47) de cetáceos infectados, siendo mayor en hembras y en ejemplares juveniles y crías. El ADN de herpesvirus se amplificó a partir del 12,53% (121/966) de los tejidos analizados. El sistema con mayor porcentaje de muestras positivas fue el reproductor, seguido del nervioso, tegumento, endocrino, circulatorio, urinario, digestivo, respiratorio y linfático, siendo el músculo-esquelético el menos afectado. A nivel de muestras, aquellas con mayor porcentaje de positivos fueron: corazón, vejiga urinaria, sistema nervioso central, tonsila faríngea, piel, glándulas adrenales, dientes y sangre cardíaca. Cabe destacar que en el 50,47% (54/107) los tejidos positivos (de entre los que contenían también ARN de GADPH) se determinó también la presencia de ARN con la secuencia de herpesvirus. Este hecho es indicativo de la presencia de ARN mensajero y, por lo tanto, de que se estaba produciendo replicación viral. Los neonatos fueron el grupo de edad con mayor proporción de tejidos con replicación activa.

Por último, el análisis filogenético de las secuencias amplificadas facilitó la identificación de 14 secuencias diferentes, una de las cuales se amplificó con mayor frecuencia que las demás, en el 81,58% de los animales positivos. La mayoría de las secuencias amplificadas pertenecían a la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, mientras que la mayor variedad se observó entre las pertenecientes a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*.

Los resultados de esta determinación sistemática no se incluyen en los artículos presentados en esta tesis doctoral por encontrarse aún en fase de publicación. Han sido presentados en congresos nacionales e internacionales y actualmente estamos trabajando en la incorporación a este estudio de los hallazgos macroscópicos e histopatológicos asociados.



### Publicaciones principales de este objetivo

Melero, M., García-Párraga, D., Corpa, J.M., Ortega, J., Rubio-Guerri, C., Crespo, J.L., Rivera-Arroyo, B., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2014). First molecular detection and characterization of herpesvirus and poxvirus in a Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*). *BMC Veterinary Research*, 10, 968.

Melero, M., Crespo-Picazo, J.L., Rubio-Guerri, C., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015). First molecular determination of herpesvirus from two mysticete species stranded in the Mediterranean Sea. *BMC Veterinary Research*, 11, 283.

### Aportaciones científicas relacionadas

#### ▪ Trabajo fin de máster

- ♦ Melero, M. (2011). Estudio epidemiológico, espacial y molecular de herpesvirus en los cetáceos varados en la Comunidad Valenciana en 2010 y 2011. Potencial mejora de su diagnóstico. Tutorizado por el Dr. J.M. Sánchez-Vizcaíno.

#### ▪ Publicaciones científicas indexadas

- ♦ Rubio-Guerri, C., García-Párraga, D., Nieto-Pelegrín, E., Melero, M., Álvaro, T., Valls, M., Crespo, J.L., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015). Novel adenovirus detected in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) suffering from self-limiting gastroenteritis. *BMC Veterinary Research*, 11, 53.
- ♦ Rubio-Guerri, C.\*, Melero, M.\* (\*equal contributors), Esperón, F., Bellière, E.N., Arbelo, M., Crespo, J.L., Sierra, E., García-Párraga, D., Esperón, F., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013). Unusual striped dolphin mass mortality episode related to cetacean morbillivirus in the Spanish Mediterranean Sea. *BMC Veterinary Research*, 9, 106.
- ♦ Rubio-Guerri, C., Melero, M., Rivera-Arroyo, B., Bellière, E.N., Crespo, J.L., García-Párraga, D., Esperón, F., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013). Simultaneous diagnosis of Cetacean Morbillivirus infection in dolphins stranded in the Spanish Mediterranean Sea in 2011 using a novel Universal Probe Library (UPL) RT-PCR assay. *Veterinary Microbiology*, 165(1-2), 109-114.

### ■ Ponencias

- ♦ Melero, M. (2014). **Virología en varamientos. I Congreso de animales marinos.** Madrid.
- ♦ Rubio-Guerri, C., Melero, M. (2014). **Sanidad marina: Presencia de nuevos virus en cetáceos.** *Jornada de virología en Sanidad Animal y Pública.* Murcia.

### ■ Congresos internacionales (comunicaciones orales)

- ♦ *44th Symposium of the European Association for Aquatic Mammals (EAAM).* Benidorm. 2016:
  - Pickford, A., Melero, M., Rivera, B., Crespo-Picazo, J.L., Rubio-Guerri, C., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Poxvirus detection in skin lesions in wild and captive cetaceans.**
  - Rubio-Guerri, C., Jiménez, M.A., Melero, M., Bellière, E.N., Crespo, J.L., Díaz-Delgado, J., Sierra, E., Arbelo, M., García-Párraga, D., Esperón, F., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **New cetacean morbillivirus with Atlantic origin circulating in Mediterranean striped dolphin population.**
- ♦ *46th Annual International Association for Aquatic Animal Medicine (IAAAM) Conference.* Chicago, Estados Unidos de América. 2015:
  - Melero, M., Rubio-Guerri, C., Crespo, J.L., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Herpesvirus determination in free-ranging cetaceans stranded in the Mediterranean Sea between June 2010 and June 2013.**
  - Rubio-Guerri, C., García-Párraga, D., Barros, C., Melero, M., Álvaro, T., Valls, M., Crespo, J.L., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Adenovirus: should be in the differential diagnosis of gastrointestinal disease in dolphins?.**
- ♦ *X International Congress of Veterinary Virology (ESVV).* Montpellier, Francia. 2015:
  - Malmberg, M., Rubio-Guerri, C., García-Párraga, D., Nieto-Pelegrín, E., Melero, M., Álvaro, T., Valls, M., Crespo, J.L., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Belak, S., Granberg, F. **Genetic characterization of a novel adenovirus detected in captive bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) suffering from self-limiting gastroenteritis.**

- ♦ *42th Symposium of the European Association for Aquatic Mammals (EAAM)*.  
Puerto de la Cruz. 2014:
  - Melero, M., Rubio-Guerri, C., García-Párraga, D., Álvaro, T., Valls, M., Crespo, J.L., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Herpesvirus in beluga whale: relationship with appearance of lesions and routes of transmission.
  - Garcia-Párraga, D., Rubio-Guerri, C., Melero, M., Álvaro, T., Valls, M., Crespo-Picazo, J.L., Milo, C., Sánchez-Vizcaíno, J.M. First dolphin adenovirus outbreak in a population of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*).
  - Rubio-Guerri, C., García-Párraga, D., Melero, M., Valls, M., Álvaro, T., Crespo, J.L., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Novel adenovirus in captive bottlenose dolphins: diagnosis and phylogenetic analysis.
- ♦ *41th Symposium of the European Association for Aquatic Mammals (EAAM)*.  
Nuremberg. Alemania. 2013:
  - Rubio-Guerri, C., Jiménez, M.A., Bellière, E.N., Esperón, F., Melero, M., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Description of a novel strain of dolphin morbillivirus from a stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) on Spanish Mediterranean Coast.
- ♦ *IX International Congress of Veterinary Virology (ESVV)*. Madrid. 2012:
  - Rubio-Guerri, C., Melero, M., Esperón, F., Bellière, E.N., Arbelo, M., Crespo, J.L., Sierra, E., García D, Sánchez-Vizcaíno, J.M. Cetacean Morbillivirus: Health evaluation of stranded dolphins in Spanish Mediterranean sea during 2011.
- ♦ *40th Symposium of the European Association for Aquatic Mammals (EAAM)*.  
Madrid. 2012:
  - Melero, M., Rubio-Guerri, C., Bellière, E.N., Esperón, F., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Elevated presence and variability of Herpesvirus in cetaceans stranded during 2010 and 2011 in the Region of Valencia.

- Rubio-Guerri, C., Esperón, F., Melero, M., Bellière, E.N., Arbelo, M., Crespo, J.L., Sierra, E., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Unusual striped dolphin mass mortality episode related to cetacean Morbillivirus in the Spanish Mediterranean Sea.
- ♦ *39th Symposium of the European Association for Aquatic Mammals (EAAM)*. Barcelona. 2011:
  - Rubio-Guerri, C., Melero, M., Crespo, J.L., Bellière, E.N., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Esperón, F. First identification of three sequences of alpha and gamma herpesviruses from cetaceans stranded in the Spanish Mediterranean coasts.
- **Congresos nacionales (comunicaciones orales)**
  - ♦ *IX Congreso de la Sociedad Española de Cetáceos*. Las Palmas de Gran Canaria. 2016:
    - Melero, M., Crespo-Picazo, J.L., Rubio-Guerri, C., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Determinación de herpesvirus en tejidos de cetáceos varados en el Mediterráneo valenciano entre 2010 y 2013.
    - Rubio-Guerri, C., Jiménez, M.A., Melero, M., Bellière, E.N., Crespo-Picazo, J.L., Díaz-Delgado, J., Sierra, E., Arbelo, M., García-Párraga, D., Esperón, F., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Identificación de una nueva secuencia de morbillivirus de los cetáceos (CeMV) de origen atlántico en la población de delfines listados del Mediterráneo.



## CASE REPORT

## Open Access

# First molecular detection and characterization of herpesvirus and poxvirus in a Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*)

Mar Melero<sup>1\*</sup>, Daniel García-Párraga<sup>2</sup>, Juan Manuel Corpa<sup>3</sup>, Joaquín Ortega<sup>3</sup>, Consuelo Rubio-Guerri<sup>1</sup>, José Luis Crespo<sup>2</sup>, Belén Rivera-Arroyo<sup>1</sup> and José Manuel Sánchez-Vizcaíno<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Herpesvirus and poxvirus can infect a wide range of species: herpesvirus genetic material has been detected and amplified in five species of the superfamily *Pinnipedia*; poxvirus genetic material, in eight species of *Pinnipedia*. To date, however, genetic material of these viruses has not been detected in walrus (*Odobenus rosmarus*), another marine mammal of the *Pinnipedia* clade, even though anti-herpesvirus antibodies have been detected in these animals.

**Case presentation:** In February 2013, a 9-year-old healthy captive female Pacific walrus died unexpectedly at L'Oceanografic (Valencia, Spain). Herpesvirus was detected in pharyngeal tonsil tissue by PCR. Phylogenetic analysis revealed that the virus belongs to the subfamily *Gammaherpesvirinae*. Poxvirus was also detected by PCR in skin, pre-scapular and tracheobronchial lymph nodes and tonsils. Gross lesions were not detected in any tissue, but histopathological analyses of pharyngeal tonsils and lymph nodes revealed remarkable lymphoid depletion and lymphocytolysis. Similar histopathological lesions have been previously described in bovine calves infected with an alphaherpesvirus, and in northern elephant seals infected with a gammaherpesvirus that is closely related to the herpesvirus found in this case. Intracytoplasmic eosinophilic inclusion bodies, consistent with poxviral infection, were also observed in the epithelium of the tonsillar mucosa.

**Conclusion:** To our knowledge, this is the first molecular identification of herpesvirus and poxvirus in a walrus. Neither virus was likely to have contributed directly to the death of our animal.

**Keywords:** Herpesvirus, Poxvirus, Walrus, Pinniped

## Background

Herpesvirus can infect multiple animal species: mammals, birds, reptiles, fish, frogs and bivalves [1]. The order *Herpesvirales* consists of three families, *Herpesviridae*, *Alloherpesviridae* and *Malacoherpesviridae*, and the *Herpesviridae* family comprises three subfamilies: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* and *Gammaherpesvirinae* [2]. To date, all herpesviruses detected in marine mammals belong to either the *Alpha*- or *Gammaherpesvirinae* subfamilies [3].

Within the order *Carnivora*, in the suborder *Caniformia*, herpesvirus has been described in 11 species [4-10], five of which belong to the superfamily *Pinnipedia*: three form part of the family *Phocidae* [harbor seal (*Phoca vitulina*) [11-14], Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*) [15], northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) [16]], and two belong to the family *Otariidae* [California sea lion (*Zalophus californianus*) [17,13,3] and South American fur seal (*Arctocephalus australis*) [18]]. Antibodies against phocine herpesvirus (PhHV) 1 and 2 have been detected in walruses from Alaska and Russia with high seroprevalence [189/341 (55.42%) for PhHV-1, 98/341 (28.74%) for PhHV-2, 61/341 (17.89%) for both viruses in the same sample and 115/341 (33.72%) were negative] [19]. However, we are

\* Correspondence: mar.melero@sanidadanimal.info

<sup>1</sup>VISAVET Center, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



unaware of studies examining the molecular detection and sequencing of herpesvirus genetic material from walrus.

Poxviruses are pathogens that affect humans and numerous species of wild and domestic animals [20]. While some are species-specific, others can infect a broad species range [21]. Poxvirus has been identified in eight species of the superfamily *Pinnipedia* [22]: five belong to the family *Phocidae* [grey seal (*Halichoerus grypus*) [23-28], harbor seal (*Phoca vitulina*) [29,30,28], Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) [31], spotted seal (*Phoca largha*) [32,33] and Weddell seal (*Leptonychotes weddellii*) [34]], and three belong to the family *Otariidae* [California sea lion (*Zalophus californianus*) [28], Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) [35,32] and South American sea lion (*Otaria flavescens*) [36]]. Some of these pinniped poxviruses have zoonotic potential and can cause lesions in humans, mostly on the skin [23,37].

This article reports the first detection of herpesvirus and poxvirus in a walrus, as well as the first herpesvirus sequences from the family *Odobenidae*.

### Case presentation

An adult female Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*, Illiger, 1815), born in June 2003 and housed at L'Oceanografic (Valencia, Spain), died unexpectedly on February 18, 2013. A full necropsy was performed early the next day according to the protocol of the Woods Hole Oceanographic Institution [38]. The animal presented good nutritional condition and moderate post-mortem autolysis. Lungs were diffusely dark red and heavy and a clear fluid and foam oozed from a surface cut. No other significant gross lesions were observed.

Representative samples from several organs were collected during necropsy: skin; blubber; muscle; pharyngeal tonsils; thyroid; thymus; tracheobronchial, pre-scapular and mesenteric lymph nodes; lung; heart; stomach; gut; liver; pancreas; spleen; adrenal glands; kidneys; urinary bladder; ovary; genital mucosa; mammary gland; brain; and spinal cord. Three sets of tissue samples and swabs were collected and processed in different ways: one set was used for general bacteriology and stored in transport medium, one was used for virology analysis and stored at -80°C and one was used for conventional histopathology analysis and preserved in 10% neutral buffered formalin.

Formalin-fixed samples were subsequently dehydrated through graded alcohols before being embedded in paraffin wax. Several 4 µm-thick sections were cut from each sample and stained using hematoxylin and eosin.

Lung histology showed diffuse congestion with multifocal hemorrhages. In the alveolar spaces, large amounts of homogeneous eosinophilic material and numerous bacteria were observed in the absence of an associated inflammatory reaction. Pharyngeal tonsils and lymph nodes showed marked lymphoid depletion with lymphocytolysis,

which was more evident at the germinal core and was characterized by pyknosis, karyorrhexis and macrophage phagocytosis of cellular debris (Figure 1A). Small round eosinophilic structures were also observed within the cytoplasm of the epithelial cells in the tonsillar mucosa (Figure 1B). These findings were consistent with poxviral intracytoplasmic inclusion bodies. No other findings were observed in any tissue.

For virology analysis, samples of all necropsied tissues were homogenized using a Bullet Blender™ (Next Advance, Averill Park, NY, USA), diluting samples 1:10. DNA of homogenates was extracted using the High Pure Template Preparation Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and total RNA was extracted using the Nucleo Spin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturers' instructions.

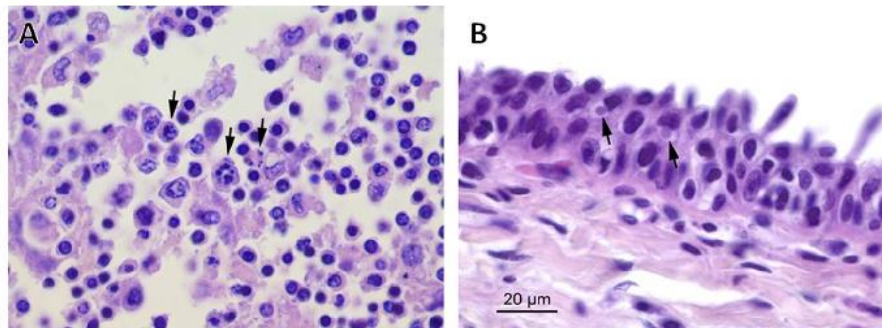
Samples were analyzed for the presence of herpesvirus, poxvirus and calicivirus.

For herpesvirus detection, a previously described pan-herpesvirus nested polymerase chain reaction (PCR) targeting the DNA polymerase (DNApol) gene was performed for DNA extracts of all sampled tissues [39], and the reactions were positive only for tonsillar tissue. The PCR product was purified by a PCR Purification kit (Qiagen, Germantown, USA) and sequenced to yield a 212-bp sequence, excluding primers (GenBank acc. no. KF972426). Sequence analysis confirmed the herpesvirus diagnosis and revealed the virus to be closely related to gammaherpesvirus. For more detailed virus characterization, a genus-specific PCR for gammaherpesvirus was performed to amplify a region of the glycoprotein B (gB) gene using the set of primers GH1, as previously described [6]. The PCR product was again purified and sequenced, yielding a 453-bp fragment, excluding primers (GenBank acc. no. KF972425).

Phylogenetic analysis of both herpesvirus sequences was carried out using MEGA 5.2 software [40]. In order to evaluate the accuracy of alignments and therefore their capability to produce reliable phylogenetic trees, average amino acid identity was evaluated [41,42]. Average amino acid p-distances (1-amino acid identity) were 0.5068 for the DNApol alignment and 0.4882 for the gB alignment. Since the acceptance threshold was <0.8 for the average p-distance, both sequence alignments were considered adequate. Moreover, in both alignments, each sequence from the databases was compared with the novel sequence from walrus tonsillar tissue in order to calculate the amino acid p-distance between them.

Phylogenetic trees based on amino acid sequences were constructed using MEGA 5.2 with the maximum parsimony (MP) method and the subtree-pruning-and-regrafting (SPR) algorithm [40]. A bootstrap consensus tree from 500 replications was inferred.





**Figure 1** *Odobenus rosmarus divergens*. Pharyngeal tonsil. (A) Numerous swollen cells showing condensed chromatin at the periphery of the cell (karyorrhexis) in the germinal center of a lymphoid follicle. (B) Intracytoplasmic inclusion bodies (arrow) are observed within epithelial cells. Hematoxylin and eosin.

The phylogenetic analysis revealed that the virus belongs to the subfamily *Gammaherpesvirinae* and suggested that the virus is a member of the genus *Percavirus* (Figure 2). The following sequences in GenBank are most closely related to the herpesvirus DNApol gene sequence from our walrus, based on amino acid p-distances: Hawaiian monk seal herpesvirus [GenBank acc. no. DQ093191.1; amino acid (aa) p-distance 0.2545], northern elephant seal herpesvirus (DQ183057.1; aa p-distance 0.2778) and otariid herpesviruses 3 (DQ789370.2) and 4 (JX244190.1) (nearly identical for this gene region; aa p-distance 0.3818) (Figure 2A). Sequences from the gB gene were unavailable for the four viruses with the most similar DNApol sequences to that of our isolate from walrus, preventing us from analyzing whether the four viruses also encoded similar gB. Among deposited gB gene sequences, the ones closest to our isolate are from mustelid herpesvirus 1 (AF376034.1; aa p-distance 0.1400) and canid herpesvirus 2 (KF471019.1; aa p-distance 0.1467) (Figure 2B). The DNApol gene sequence of *Odobenus rosmarus* herpesvirus showed an aa p-distance of 0.4909 from mustelid herpesvirus 1 and 0.5091 from canid herpesvirus 2.

Phylogenetic branching of herpesvirus resembles that of its hosts [43,13,10]. Consistent with this idea, the DNApol sequences from Genbank most closely related to our isolate are from pinnipeds. Moreover, among the few available gB sequences, the ones most similar to our isolate belong to the same Suborder (*Caniformia*).

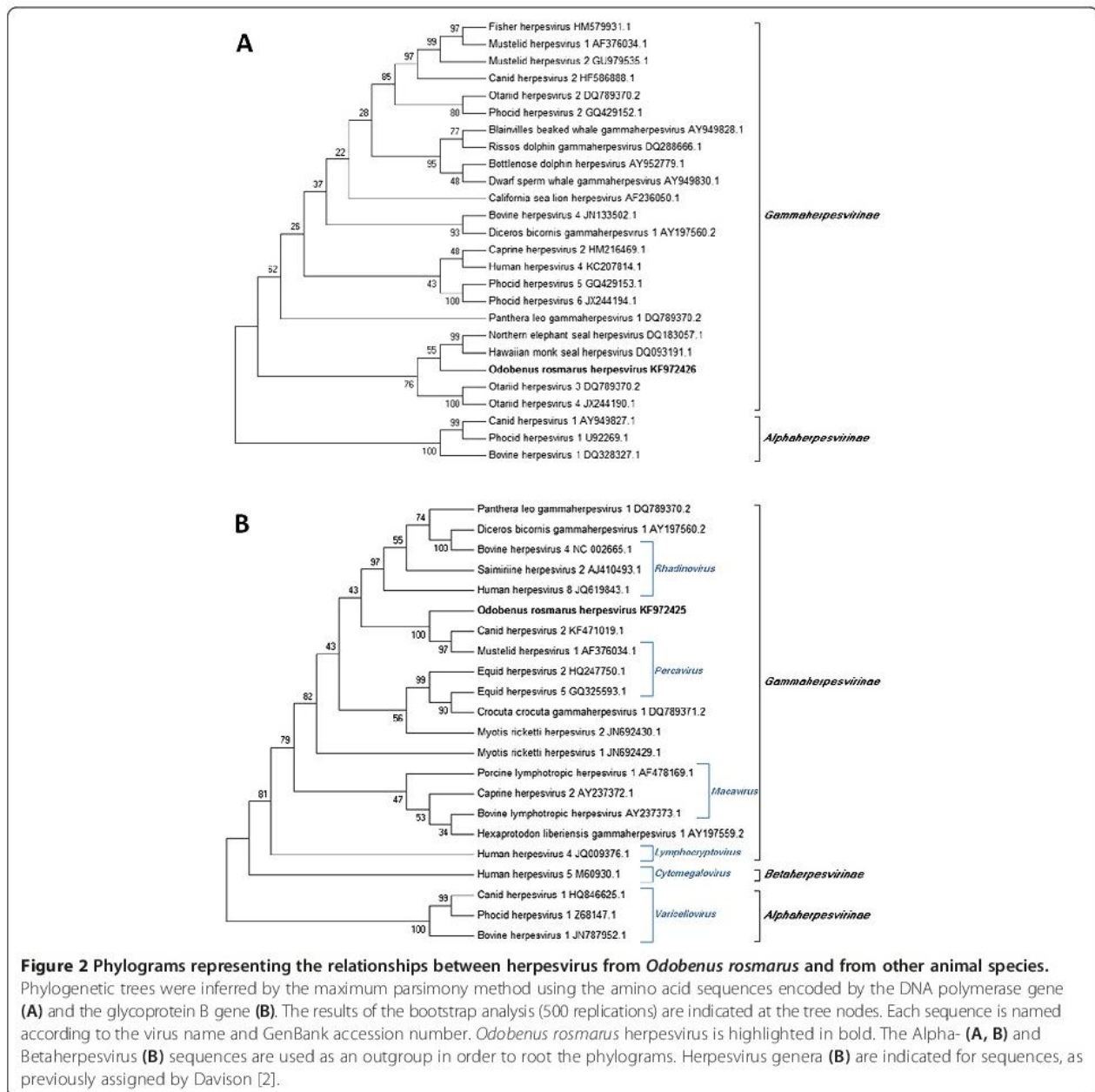
In order to determine whether the herpesvirus in our walrus was actively replicating or was in a period of latency at the time of death, the RNA extract from the tonsil sample was used as template in a retrotranscription step with the enzyme Affinity Script QPCR cDNA Synthesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) following the manufacturer's instructions. The cDNA was used in pan-herpesvirus nested PCR targeting the DNApol gene [39]. Although the PCR clearly gave the expected product, the band in the agarose gel was considerably less

intense than that obtained with the DNA sample (data not shown). This result suggests that the herpesvirus was replicating at the time of death in the sampled tonsil tissue as messenger RNA (mRNA) with the herpesvirus sequence was detected.

To evaluate the immune response that our *Odobenus rosmarus* herpesvirus can cause, two direct ELISAs were performed, one for detecting anti-canine herpesvirus immunoglobulin G (IgG) and another for detecting anti-canine herpesvirus immunoglobulin M (IgM). Serum samples were collected from the studied walrus and three other walruses in the captive population of five animals at approximately 2, 6 and 15 months before the studied animal's death. The fifth walrus in the population could not be sampled at the same points because it died before the animal under study; instead, we analyzed a serum sample from the fifth animal that had been collected 20 months before the studied animal died. Based on the criterion that positive samples have an optical density of at least 1.00, all samples that we tested were negative for anti-canine herpesvirus IgG.

When the ELISA to detect anti-canine herpesvirus IgM was performed, serum samples from the studied walrus were positive while all remaining samples from other individuals were negative. Given that IgM is the earliest immunoglobulin to be up-regulated after an infection, and no IgG increase was detected in our walrus, it appears that our case was in an early stage of infection involving only a primary immune response at the time of its death.

All tissue samples were tested for the presence of poxvirus using two conventional PCRs targeting the poxvirus DNApol gene or the parapoxvirus DNApol gene, as previously described [32]. Skin and pre-scapular lymph nodes were strongly positive for the desired poxvirus DNApol gene amplicon, while tracheobronchial lymph nodes and tonsil were weakly positive. PCR products were purified and sequenced, yielding a 497-bp

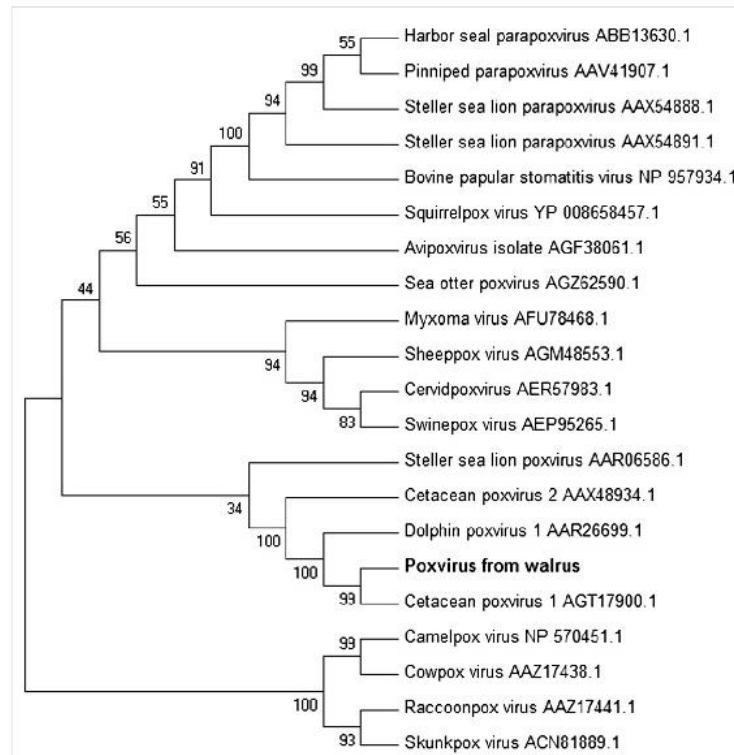


sequence from the poxvirus DNAPol gene (excluding primers). The viral sequences from the various positive tissues were identical, confirming a diagnosis of poxviral infection.

Phylogenetic analysis was performed using MEGA 5.2 software, which evaluated average amino acid identity and produced a p-distance of 0.3159. Since this p-distance is still less than 0.8, the approach offers acceptable alignment to produce reliable phylogenetic trees. The phylogenetic tree (Figure 3) was constructed using the MP method equipped with the SPR algorithm and a bootstrap test of 500 replications.

Phylogenetic analysis showed the poxvirus sequence from our walrus to differ by only three nucleotides from the otherwise identical amino acid sequence of a *Cetacean poxvirus 1* from a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*) (GenBank KC409049.1) (Figure 3). In order to verify whether this result was due to sample contamination, poxvirus analysis in the walrus samples was repeated twice independently; DNA was homogenized and extracted with no positive controls, and the same result was obtained as described above. This striking sequence similarity between cetacean poxvirus 1 and our walrus isolate suggests that this poxvirus may have





**Figure 3** Phylogram representing relationships between the sequences encoded by the poxvirus DNA polymerase gene from different host species. This unrooted phylogenetic tree was constructed using the maximum parsimony method based on amino acid sequences. The results of the bootstrap analysis (500 replications) are indicated at the tree nodes. Each sequence name is composed of the virus name and the GenBank accession number. Poxvirus from walrus is highlighted in bold.

a broad host range. The walrus in our study lived in the same building with two beluga whales (*Delphinapterus leucas*). Although the water and enclosures were different for both species and direct contact was impossible, the trainers were the same, suggesting that they may be the source of poxvirus cross-contamination among species. Poxviruses are enveloped viruses and most can persist in the environment for long periods of time [44-46], which increases the risk of viral spread via fomites. The mechanical transport of viruses by trainers is possible. In addition, some marine mammal poxviruses have been described as zoonotic [23,37], and in this case, the virus may have also infected the trainers and remained latent or replicated slowly, without causing injury.

To test this hypothesis, poxvirus was determined in samples of healthy skin, skin lesions and blood from the two beluga whales. These animals shared the same facility with the walrus during almost 8 years. Oral swabs from the three trainers were collected using the same protocol as for the walrus samples. All samples were negative for cetacean poxvirus. From this analysis of only two tissues at a single point in time, we cannot rule out beluga whales as the source of infection,

especially since the animals shared the same building for 8 years, so transmission could have occurred at any point. All the animals were housed at the Oceanographic of Valencia, and all the national and international permits were in order. No special permits were required for this research because serum samples from the walruses (antibodies against herpesvirus determination) and blood and skin samples from the beluga whales (poxvirus determination) were performed within the Oceanographic's routine procedures.

In order to complete the viral diagnosis, RNA of all the samples was tested for calicivirus by real-time PCR as described [47], and all samples were negative for calicivirus determination.

General bacteriology analysis of different tissue samples did not identify any potential pathogens; some bacteria were found but these were thought to be either components of the normal bacterial flora or post mortem contaminants. These results are consistent with histopathological findings, which detected no tissue damage or inflammatory reaction associated with *in vivo* bacterial infection.

Although the histological findings observed in pharyngeal tonsil and lymph nodes were nonspecific, lymphoid

depletion and lymphocytolysis have previously been associated with viral infections in other mammals, such as in calves experimentally infected with alphaherpesvirus [48,49], or northern elephant seals infected with gamma-herpesvirus [16], which are closely related phylogenetically to the *Odobenus rosmarus* herpesvirus reported here (Figure 2A). Although no typical intranuclear inclusion bodies were observed in the examined organs, herpesviral inclusion bodies are known to be frequent in the very early stages of infection, but they are rarely observed beyond day 7 post-infection [50].

Based on clinical history and necropsy findings, the sudden death of this walrus was likely due to drowning and not to the herpesvirus or poxvirus infections described in this paper.

## Conclusions

Histopathology and identification and phylogenetic characterization of herpesvirus and poxvirus in our case, together with the presence of RNA with the herpesvirus sequence, indicate that gammaherpesvirus is the most probable etiologic agent responsible for the microscopic lesions of the tonsil and lymph nodes, and that poxvirus is the most likely cause of the intracytoplasmic inclusion bodies found in the tonsil mucosa. To the best of our knowledge, this report describes the first detection and characterization of herpesvirus and poxvirus in walrus.

## Abbreviations

PCR: Polymerase chain reaction; PhV: Phocine herpesvirus; DNApol: DNA polymerase; gB: Glycoprotein B; MP: Maximum parsimony; SPR: Subtree-pruning-and-regrafting; aa: Amino acid; IgG: Immunoglobulin G; IgM: Immunoglobulin M.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

MM contributed to writing the manuscript. DGP, JMC, JO, CRG, JLC and BRA helped draft the manuscript. DGP, JMC, JO and JLC contributed to clinical diagnosis and necropsy performance and evaluation. JMC and JO contributed by performing the histopathology analysis. MM, CRG and BRA contributed with virology determinations. MM performed phylogenetic analyses. JMSV contributed to coordinating and reviewing the whole process. All the authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

The authors thank Rocío Sánchez from VISAVET for her exceptional laboratory technical assistance and the entire Arctic and Veterinary Team of the Oceanographic for its excellent work and commitment to provide the best care to the animals. The authors are very grateful to Francisco Javier García Peña, Head of the Bacteriology Service of the Central Veterinary Laboratory of Algete, for performing the general bacteriology analyses. The authors also thank Mario Soriano-Navarro, from the Electron Microscopy Service of the Príncipe Felipe Research Center, for his excellent technical assistance. The authors thank Penta Laboratory, mainly Ángela Sastre, for IgG and IgM against herpesvirus determination. This work was supported by a collaborative agreement involving the Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias (Valencia), the VISAVET Center of Complutense University of Madrid and the Pfizer Foundation. CRG is the recipient of an FPU grant from the Spanish Ministry of Education. MM is the recipient of a PhD student grant from the Complutense University of Madrid.

## Author details

<sup>1</sup>VISAVET Center, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Veterinary Services, Oceanographic, Parques Reunidos Valencia, Ciudad de las Artes y las Ciencias, 46013, Valencia, Spain. <sup>3</sup>Biomedical Sciences Research Institute (PASAPTA-Pathology Group), Veterinary School, Universidad CEU Cardenal Herrera, Av. Seminario s/n, 46113 Moncada, Valencia, Spain.

Received: 28 September 2014 Accepted: 16 December 2014

Published online: 21 December 2014

## References

- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E: **The order Herpesvirales**. *Arch Virol* 2009, **154**:171–177.
- Davison AJ: **Herpesvirus systematics**. *Vet Microbiol* 2010, **143**:52–69.
- Venn-Watson S, Benham C, Gulland FM, Smith CR, St Leger J, Yochem P, Nollens H, Blas-Machado U, Saliki J, Colegrove K, Wellehan JF Jr, Rivera R: **Clinical relevance of novel Otarine herpesvirus-3 in California sea lions (*Zalophus californianus*): lymphoma, esophageal ulcers, and strandings**. *Vet Res* 2012, **43**:85.
- Banks M, King DP, Daniells C, Stagg DA, Gavriel-Widen D: **Partial characterization of a novel gammaherpesvirus isolated from a European badger (*Meles meles*)**. *J Gen Virol* 2002, **83**:1325–1330.
- King DR, Mutukwa N, Lesellier S, Cheeseman C, Chambers MA, Banks M: **Detection of mustelid herpesvirus-1 infected European badgers (*Meles meles*) in the British Isles**. *J Wildl Dis* 2004, **40**:99–102.
- Ehlers B, Dural G, Yasmum N, Lembo T, de Thoisy B, Ryser-Degiorgis MP, Ulrich RG, McGeoch DJ: **Novel mammalian herpesviruses and lineages within the Gammaherpesvirinae: cospeciation and interspecies transfer**. *J Virol* 2008, **82**:3509–3516.
- Dandár E, Szabó L, Heltai M, Doszpoly A: **Adenovírusok és herpesvírusok előfordulásának felmérése emlős ragadozók (Carnivora) mintáinak PCR-vizsgálatával: borz-herpesvírus első kimutatása Magyarországon. (PCR screening of mammalian predators (Carnivora) for adenoviruses and herpesviruses: the first detection of a mustelid herpesvirus in Hungary/in Hungarian)**. *Magyar Állatorvosok Lapja* 2010, **132**:302–308.
- Gagnon CA, Tremblay J, Larochelle D, Music N, Tremblay D: **Identification of a novel herpesvirus associated with cutaneous ulcers in a fisher (*Martes pennanti*)**. *J Vet Diagn Invest* 2011, **23**:986–990.
- Tseng M, Fleetwood M, Reed A, Gill VA, Harris RK, Moeller RB, Lipscomb TP, Mazet JA, Goldstein T: **Mustelid herpesvirus-2, a novel herpes infection in northern sea otters (*Enhydra lutris kenyoni*)**. *J Wildl Dis* 2012, **48**:181–185.
- Cabello J, Esperón F, Napolitano C, Hidalgo JA, Millán J: **Molecular identification of a novel gammaherpesvirus in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*)**. *J Gen Virol* 2013, **94**:2745–2749.
- King DP, Parselles R, Gulland FM, Lapointe JM, Lowenstein LJ, Ferrick DA, Stott JL: **Antigenic and nucleotide characterization of a herpesvirus isolated from Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardsii*)**. *Arch Virol* 1998, **143**:2021–2027.
- Himworth CG, Haulena M, Lambourn DM, Gaydos JK, Huggins J, Calambokidis J, Ford JK, Zaremba K, Raverty S: **Pathology and epidemiology of phocid herpesvirus-1 in wild and rehabilitating harbor seals (*Phoca vitulina richardsii*) in the northeastern Pacific**. *J Wildl Dis* 2010, **46**:1046–1051.
- Maness HT, Nollens HH, Jensen ED, Goldstein T, LaMere S, Childress A, Sykes J, St Leger J, Lacave G, Latson FE, Wellehan JF Jr: **Phylogenetic analysis of marine mammal herpesviruses**. *Vet Microbiol* 2011, **149**:23–29.
- Roth SJ, Fischer BK, Kovacs KM, Lydersen C, Osterrieder N, Tryland M: **Phocine herpesvirus 1 (PhHV-1) in harbor seals from Svalbard, Norway**. *Vet Microbiol* 2013, **164**:286–292.
- Goldstein T, Gulland FMD, Braun RC, Antonelis GA, Kashinsky L, Rowles TK, Mazet JAK, Dalton LM, Aldridge BM, Stott JL: **Molecular identification of a novel gammaherpesvirus in the endangered Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*)**. *Mar Mamm Sci* 2006, **22**:465–471.
- Goldstein T, Lowenstein LJ, Lipscomb TP, Mazet JA, Novak J, Stott JL, Gulland FM: **Infection with a novel gammaherpesvirus in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*)**. *J Wildl Dis* 2006, **42**:830–835.
- Lipscomb TP, Scott DP, Garber RL, Krafft AE, Tsai MM, Lichy JH, Taubenberger JK, Schulman FY, Gulland FM: **Common metastatic carcinoma of California sea lions (*Zalophus californianus*): evidence of**



- genital origin and association with novel gammaherpesvirus. *Vet Pathol* 2000, **37**:609–617.
18. Dagleish MP, Barrows M, Maley M, Killick R, Finlayson J, Goodchild R, Valentine A, Saunders R, Willoughby K, Smith KC, Stidworthy MF: **The first report of otarine herpesvirus-1-associated urogenital carcinoma in a South American fur seal (*Arctocephalus australis*).** *J Comp Pathol* 2013, **149**:119–125.
  19. Zarnke RL, Harder TC, Vos HW, Ver Hoef JM, Osterhaus DME: **Serologic survey for Phocid Herpesvirus-1 and -2 in marine mammals from Alaska and Russia.** *J Wildl Dis* 1997, **33**:459–465.
  20. Baker KS, Murcia PR: **Poxviruses in bats ... so what?** *Viruses* 2014, **6**:1564–1577.
  21. Haller SL, Peng C, McFadden G, Rothenburg S: **Poxviruses and the evolution of host range and virulence.** *Infect Genet Evol* 2014, **21**:15–40.
  22. Roess AA, Levine RS, Barth L, Monroe BP, Carroll DS, Damon IK, Reynolds MG: **Sealpox virus in marine mammal rehabilitation facilities, North America, 2007–2009.** *Emerg Infect Dis* 2011, **17**:2203–2208.
  23. Hicks BD, Worthy GA: **Sealpox in captive grey seals (*Halichoerus grypus*) and their handlers.** *J Wildl Dis* 1987, **23**:1–6.
  24. Osterhaus AD, Broeders HW, Visser IK, Teppema JS, Vedder EJ: **Isolation of an orthopoxvirus from pox-like lesions of a grey seal (*Halichoerus grypus*).** *Vet Rec* 1990, **127**:91–92.
  25. Stack MJ, Simpson VR, Scott AC: **Mixed poxvirus and calicivirus infections of grey seals (*Halichoerus grypus*) in Cornwall.** *Vet Rec* 1993, **132**:163–165.
  26. Osterhaus AD, Broeders HW, Visser IK, Teppema JS, Kuiken T: **Isolation of a parapoxvirus from pox-like lesions in grey seals.** *Vet Rec* 1994, **135**:601–602.
  27. Simpson VR, Stuart NC, Stack MJ, Ross HA, Head JC: **Parapox infection in grey seals (*Halichoerus grypus*) in Cornwall.** *Vet Rec* 1994, **134**:292–296.
  28. Nollens HH, Gulland FM, Jacobson ER, Hernandez JA, Klein PA, Walsh MT, Condit RC: **Parapoxviruses of seals and sea lions make up a distinct subclade within the genus Parapoxvirus.** *Virology* 2006, **349**:316–324.
  29. Becher P, König M, Müller G, Siebert U, Thiel HJ: **Characterization of sealpox virus, a separate member of the parapoxviruses.** *Arch Virol* 2002, **147**:1133–1140.
  30. Müller G, Gröters S, Siebert U, Rosenberger T, Driver J, König M, Becher P, Hetzel U, Baumgärtner W: **Parapoxvirus infection in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German North Sea.** *Vet Pathol* 2003, **40**:445–454.
  31. Toplu N, Aydoğan A, Oğuzoglu TC: **Visceral leishmaniosis and parapoxvirus infection in a Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*).** *J Comp Pathol* 2007, **136**:283–287.
  32. Bracht AJ, Brudek RL, Ewing RY, Manire CA, Burek KA, Rosa C, Beckmen KB, Maruniak JE, Romero CH: **Genetic identification of novel poxviruses of cetaceans and pinnipeds.** *Arch Virol* 2006, **151**:423–438.
  33. Ohno Y, Inoshima Y, Maeda K, Ishiguro N: **Molecular analysis of parapoxvirus from a spotted seal *Phoca largha* in Japan.** *Dis Aquat Organ* 2011, **97**:11–16.
  34. Tryland M, Klein J, Nordøy ES, Blix AS: **Isolation and partial characterization of a parapoxvirus isolated from a skin lesion of a Weddell seal.** *Virus Res* 2005, **108**:83–87.
  35. Burek KA, Beckmen K, Gelatt T, Fraser W, Bracht AJ, Smolarek KA, Romero CH: **Poxvirus infection of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) in Alaska.** *J Wildl Dis* 2005, **41**:745–752.
  36. Wilson TM, Poglayen-Neuwall I: **Pox in South American sea lions (*Otaria byronia*).** *Can J Comp Med* 1971, **35**:174–177.
  37. Clark C, McIntyre PG, Evans A, McInnes CJ, Lewis-Jones S: **Human sealpox resulting from a seal bite: confirmation that sealpox virus is zoonotic.** *Br J Dermatol* 2005, **152**:791–793.
  38. Puglianes KR, Bogomolni A, Touhey KM, Herzog SM, Harry CT, Moore MJ: **Marine mammal necropsy: an introductory guide for stranding responders and field biologists.** In *Woods Hole Oceanog. Inst. Tech. Rept. WHOI-2007-06*. 2007.
  39. VanDevanter DR, Warren P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, Rose TM: **Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR.** *J Clin Microbiol* 1996, **34**:1666–1671.
  40. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** *Mol Biol Evol* 2011, **28**:2731–2739.
  41. Thompson JD, Plewniak F, Poch O: **A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**:2682–2690.
  42. Ogden TH, Rosenberg MS: **Multiple sequence alignment accuracy and phylogenetic inference.** *Syst Biol* 2006, **55**:314–328.
  43. Pellet P, Roizman B: **Herpesviridae: a brief introduction.** In *Fields Virology*. 5th edition. Edited by Howley P. Philadelphia: Lippincott; 2007:2480–2499.
  44. Harper GJ: **Airborne micro-organisms: survival tests with four viruses.** *J Hyg* 1961, **59**:479–486.
  45. Kennedy-Stoskopf S: **Viral diseases.** In *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. 2nd edition. Edited by Dierauf LA, Gulland FMD. Boca Raton: CRC Press; 2001:285–307.
  46. Wood JP, Choi YW, Wendling MQ, Rogers JV, Chappie DJ: **Environmental persistence of vaccinia virus on materials.** *Lett Appl Microbiol* 2013, **57**:399–404.
  47. Reid SM, King DP, Shaw AE, Knowles NJ, Hutchings GH, Cooper EJ, Smith AW, Ferris NP: **Development of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of marine caliciviruses (genus *Vesivirus*).** *J Virol Methods* 2007, **140**:166–173.
  48. Schuh JC, Bielefeldt Ohmann H, Babiuk LA, Doige CE: **Bovine herpesvirus-1-induced pharyngeal tonsil lesions in neonatal and weanling calves.** *J Comp Pathol* 1992, **106**:243–253.
  49. Winkler MT, Doster A, Jones C: **Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves.** *J Virol* 2000, **74**:5337–5346.
  50. Caswell JL, Williams KJ: **Respiratory system.** In *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th edition. Edited by Maxie MG. Philadelphia: Elsevier; 2007:523–653.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit







## CASE REPORT

## Open Access



# First molecular determination of herpesvirus from two mysticete species stranded in the Mediterranean Sea

Mar Melero<sup>1\*</sup> , José Luis Crespo-Picazo<sup>2</sup>, Consuelo Rubio-Guerri<sup>1</sup>, Daniel García-Párraga<sup>2</sup> and José Manuel Sánchez-Vizcaíno<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Herpesvirus can infect a wide range of animal species: mammals, birds, reptiles, fish, amphibians and bivalves. In marine mammals, several alpha- and gammaherpesvirus have been identified in some cetaceans and pinnipeds species. To date, however, this virus has not been detected in any member of the *Balaenoptera* genus.

**Case presentation:** Herpesvirus was determined by molecular methods in tissue samples from a male fin whale juvenile (*Balaenoptera physalus*) and a female common minke whale calf (*Balaenoptera acutorostrata*) stranded on the Mediterranean coast of the Region of Valencia (Spain). Samples of skin and penile mucosa from the fin whale and samples of skin, muscle and central nervous system tissue from the common minke whale tested positive for herpesvirus based on sequences of the DNA polymerase gene. Sequences from fin whale were identical and belonged to the *Alphaherpesvirinae* subfamily. Only members of the *Gammaherpesvirinae* subfamily were amplified from the common minke whale, and sequences from the muscle and central nervous system were identical. Sequences in GenBank most closely related to these novel sequences were viruses isolated from other cetacean species, consistent with previous observations that herpesviruses show similar phylogenetic branching as their hosts.

**Conclusions:** To our knowledge, this is the first molecular determination of herpesvirus in the *Balaenoptera* genus. It shows that herpesvirus should be included in virological evaluation of these animals.

**Keywords:** *Balaenoptera*, Baleen whale, Cetacean virology, Common minke whale, Fin whale, Herpesvirus

## Background

Herpesviruses have been detected in a wide range of hosts, including mammals, birds, reptiles, fish, amphibians and bivalves [1]. The family *Herpesviridae* is divided into three subfamilies: *Alpha*-, *Beta*- and *Gammaherpesvirinae* [2]. All herpesviruses so far detected in marine mammals belong either to the *Alpha*- or *Gammaherpesvirinae* subfamilies [3].

In cetaceans, herpesvirus has been associated with skin lesions [4–7], genital lesions [7–11], nephritis [12], encephalitis [13–15], disseminated infections [16–18], though infection can also occur in the absence of lesions

[19]. Moreover, herpesvirus can cause immunosuppression in cetaceans [17], other animal species [20, 21] and humans [22]. Stresses on infected animals, as well as immunosuppression due to non-herpesviral cause, can cause latent herpesvirus to switch to an actively replicating state [23].

Despite analysis of several cases of herpesvirus infection in cetaceans, there is a lack of knowledge about which species are affected and how infection characteristics depend on species, sex or age.

This article reports the molecular detection of three novel herpesviruses in a fin whale (*Balaenoptera physalus*) and a common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). This is the first molecular determination of herpesvirus from individuals of the *Balaenoptera* genus, indicating that these animals can be infected by herpesvirus.

\* Correspondence: mar.melero@ucm.es

<sup>1</sup>VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Melero et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



## Case presentation

On 10 July 2011, a male fin whale stranded at Moncofa on the Mediterranean coast of Castellón in the Region of Valencia, Spain (39°48'31.78"N 0°08'49.40"W). The animal was classified as juvenile based on its length of approximately 900 cm. On 28 April 2014, a female common minke whale stranded at Santa Pola on the Mediterranean coast of Alicante, also in the Region of Valencia (38°12'47.63"N 0°33'40.47"W). The animal was 300 cm long and was classified as a calf, making it the first reported stranding of a common minke whale calf in the Spanish Mediterranean [24].

Both carcasses showed advanced decomposition and were classified as code 4 according to the criteria of Geraci & Lounsbury [25]. This poor state of preservation prevented complete necropsy, histopathology analysis and RNA virus determination. Examination of the corpses failed to show signs of gross lesions, and the cause of death for both animals remains unclear.

The following tissue samples were collected and stored at - 80 °C: skin, blubber and muscle from both animals; penile mucosa and optical nerve from the fin whale; and heart, liver, kidney, ovary and central nervous system (CNS) from the common minke whale.

The Oceanografic is part of the Stranding Network through an agreement between the "Ciudad de las Artes y las Ciencias" and the "Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural". Through this agreement both institutions have transferred to the Oceanografic the rights for veterinary assistance in cases of stranded cetaceans. This agreement includes the rights of participating in the necropsies (together with the University of Valencia) and the use of samples from the cadaveric tissue for research purposes. No samples of blood or tissues were collected from live animals and no animals were euthanized for the purpose of this study. Then, in accordance with the European Parliament and Council normative 2010/63/UE (22nd September 2010) and the Real Decreto 53/2013 (1st February 2013) in post-mortem tissue collection for research purposes, approval from the corresponding ethical committee is not required.

Total DNA was extracted from tissues using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instructions.

Herpesvirus detection was performed in all collected samples using a panherpesvirus nested polymerase chain reaction (PCR) targeting the DNA polymerase (DNApol) gene [26]. Samples of skin and penile mucosa from the fin whale gave a positive PCR result, as did skin, muscle and CNS samples from the common minke whale. Standard precautions were taken to prevent cross-contamination of samples. Negative controls for DNA extraction and PCR reactions were conducted in the

absence of template and using a previously tested negative sample, while positive reactions were conducted using known herpesvirus DNA obtained from walrus [27].

PCR products from all positive samples were purified using the PCR Purification Kit (Qiagen, Germantown, USA) and sequenced. The primers TGVseq, IYGseq, and KG1 [26] were used to obtain longer sequences. The corresponding sequences obtained with these primers covered 200, 410 and 439 base pairs (bp), excluding primers.

Sequence evaluation confirmed herpesvirus infection in both stranded animals. Three novel herpesvirus sequences were found and deposited in GenBank with the following accession numbers: KP995686, amplified from skin and penile mucosa of the fin whale; KP995687, amplified from skin of the common minke whale; and KP995688, amplified from CNS and muscle of the common minke whale.

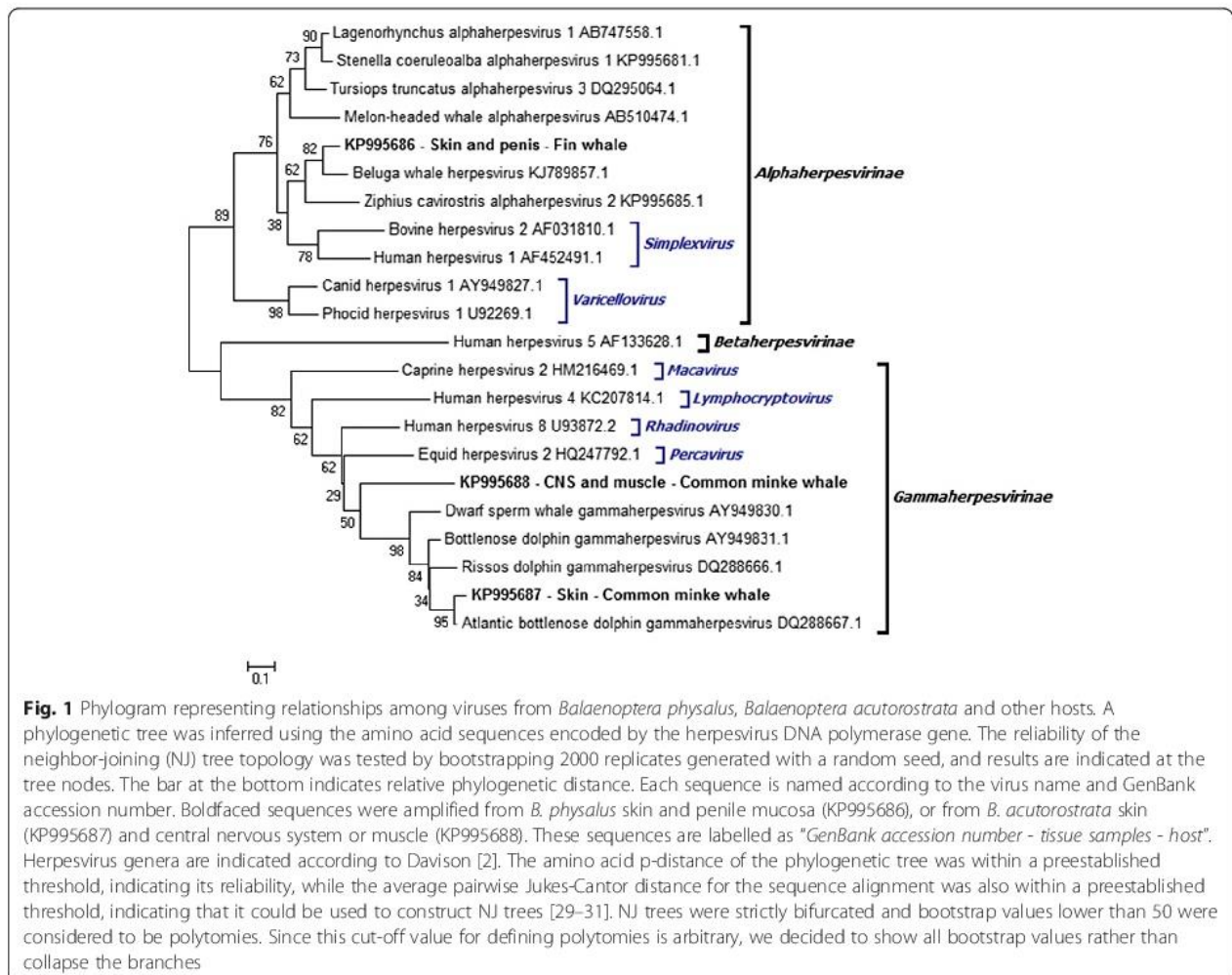
These sequences were subjected to phylogenetic analysis using MEGA 6.0 software [28], based on the 200-bp region amplified for the three herpesviruses. The accuracy of the alignment, which reflects the reliability of the resulting phylogenetic tree, was assessed by calculating the average amino acid identity and then calculating the average p-distance (1 - amino acid identity). Since the average p-distance (0.5329) was below the recommended threshold of 0.8 [29, 30], the alignment was considered acceptable. In addition, the average pairwise Jukes-Cantor distance (0.8707) was below the threshold of 1.0 [31], suggesting that the data were adequate for generating neighbor-joining trees.

A phylogenetic tree based on amino acid sequences was constructed within MEGA 6.0 using the neighbor-joining (NJ) statistical method with the Jones-Taylor-Thornton (JTT) model [32]. A bootstrap test of 2000 replications was performed to estimate tree reliability. In order to root the phylogram, a betaherpesvirus sequence was used as outgroup (Fig. 1).

Phylogenetic analysis showed that the sequence obtained from skin and penile mucosa of the fin whale (KP995686) belonged to the *Alphaherpesvirinae* subfamily (Fig. 1). The sequences most closely related to this novel sequence were from beluga whale herpesvirus (KJ789857.1; amino acid p-distance, 0.1377) and ziphilus cavirostris alphaherpesvirus (KP995685.1; 0.2656).

Sequences obtained from the CNS and muscle of the common minke whale were identical (KP995688), but different from the sequence detected in skin (KP995687; amino acid p-distance, 0.4237). Both sequences belonged to the *Gammaherpesvirinae* subfamily (Fig. 1). The sequence from the CNS and muscle differed substantially from those in GenBank, showing the closest relationship to sequences from bottlenose dolphin gammaherpesvirus (AY949831.1; 0.3609), Atlantic bottlenose





dolphin gammaherpesvirus (DQ288667.1; 0.3636), dwarf sperm whale gammaherpesvirus (AY949830.1; 0.3684), equid herpesvirus 2 (HQ247792.1; 0.3750), Risso's dolphin gammaherpesvirus (DQ288666.1; 0.3788) and human herpesvirus 8 (U93872.2; 0.3971). GenBank sequences showing the closest relationship to the sequence from the skin of the common minke whale were from Atlantic bottlenose dolphin gammaherpesvirus (DQ288667.1; 0.0667), bottlenose dolphin gammaherpesvirus (AY949831.1; 0.1833) and Risso's dolphin gammaherpesvirus (DQ288666.1; 0.2167).

The novel herpesvirus DNAPol sequences described here from fin whale and common minke whale were most closely related to DNAPol sequences from other cetacean herpesviruses. This is consistent with previous observations that herpesvirus phylogenetic branching resembles that of its hosts [27, 33–35].

Histopathological analysis of tissues with herpesvirus infection could not be performed because of the advanced stage of decomposition. The tissues in which

herpesvirus was found (skin, genital mucosa and CNS) are also mentioned in most previous reports of herpesvirus in cetaceans [4–11, 13–15]. Herpesvirus infection in these tissues may limit reproduction and cause fatal encephalitis. Nevertheless, herpesvirus infection can occur in the absence of lesions [19], and virus can enter a period of latency [36, 37].

Although our inability to perform histopathology means we do not know whether herpesvirus infection in these two stranded animals was associated with microscopic lesions or not, our results nevertheless clearly demonstrate that herpesvirus can infect members of the *Balaenoptera* genus. Therefore herpesvirus should be taken into account during pathological evaluation of these species.

## Conclusion

Novel alpha- and gammaherpesvirus have been amplified from a fin whale and a common minke whale, and these viruses show the closest phylogenetic relationships to

viruses isolated from other cetacean species. To the best of our knowledge, this is the first report of herpesviruses from these baleen whale species, as well as the first molecular determination of herpesvirus in the *Balaenoptera* genus. Therefore, herpesvirus should be included in the virological evaluation in these species.

#### Abbreviations

Bp: base pairs; CNS: central nervous system; DNApol: DNA polymerase; JTT: Jones-Taylor-Thornton; NJ: Neighbor Joining; PCR: polymerase chain reaction.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

MM wrote the manuscript, and JLCP and CRG helped revise it. MM, JLCP and CRG collected samples, and MM performed virus determination and phylogenetic analysis. JMSV and DGP coordinated and reviewed data collection, data analysis and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgments

This work was supported by a collaborative agreement involving the Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente of Valencia; the Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias of Valencia; and the VISAVET Center of Complutense University of Madrid. Mar Melero is the recipient of a PhD student grant from Complutense University of Madrid, and Consuelo Rubio-Guerri is the recipient of an FPU grant from the Spanish Ministry of Education.

#### Author details

<sup>1</sup>VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Veterinary Services, Oceanográfico, Ciudad de las Artes y las Ciencias, 46013 Valencia, Spain.

Received: 15 July 2015 Accepted: 10 November 2015

Published online: 14 November 2015

#### References

- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, et al. The order Herpesvirales. Arch Virol. 2009;154:171–7.
- Davison AJ. Herpesvirus systematics. Vet Microbiol. 2010;143:52–69.
- Venn-Watson S, Benham C, Gulland FM, Smith CR, St Leger J, Yochem P, et al. Clinical relevance of novel Otarine herpesvirus-3 in California sea lions (*Zalophus californianus*): lymphoma, esophageal ulcers, and strandings. Vet Res. 2012;43:85.
- Martineau D, Lagacé A, Bélard P, Higgins R, Armstrong D, Shugart LR. Pathology of stranded beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Québec, Canada. J Comp Pathol. 1988;98:287–311.
- Barr B, Dunn JL, Daniel MD, Banford A. Herpes-like viral dermatitis in a beluga whale (*Delphinapterus leucas*). J Wildl Dis. 1989;25:608–11.
- Van Bresse MF, Waerebeek KV, Garcia-Godos A, Dekegel D, Pastoret PP. Herpes-like virus in dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*, from coastal Peru. Mar Mamm Sci. 1994;10:354–9.
- Smolarek Benson KA, Manire CA, Ewing RY, Saliki JT, Townsend FI, Ehlers B, et al. Identification of novel alpha- and gamma-herpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales. J Virol Methods. 2006;136:261–6.
- Saliki JT, Cooper EJ, Rotstein DS, Caseltine SL, Pabst DA, McLellan WA, et al. A novel gamma-herpesvirus associated with genital lesions in a Blainville's beaked whale (*Mesoplodon densirostris*). J Wildl Dis. 2006;42:142–8.
- Van Elk CE, van de Bildt MW, de Jong AA, Osterhaus AD, Kuiken T. Herpesvirus in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): cultivation, epidemiology, and associated pathology. J Wildl Dis. 2009;45:895–906.
- Bellehumeur C, Lair S, Romero CH, Provost C, Nielsen O, Gagnon CA. Identification of a novel herpesvirus associated with a penile proliferative lesion in a beluga (*Delphinapterus leucas*). J Wildl Dis. 2015;51:244–9.
- Sierra E, Díaz-Delgado J, Arbelo M, Andradá M, Sacchini S, Fernández A. Herpesvirus-associated genital lesions in a stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in the Canary Islands. J Wildl Dis. 2015;51:696–702.
- Arbelo M, Bellière EN, Sierra E, Sacchini S, Esperón F, Andradá M, et al. Herpes virus infection associated with interstitial nephritis in a beaked whale (*Mesoplodon densirostris*). BMC Vet Res. 2012;8:243.
- Kennedy S, Lindstedt U, McAliskey MM, McConnell SA, McCullough SJ. Herpesviral encephalitis in a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). J Zoo Wildl Med. 1992;23:374–9.
- Esperón F, Fernández A, Sánchez-Vizcaino JM. Herpes simplex-like infection in bottlenose dolphin stranded in the Canary Islands. Dis Aquat Organ. 2008;81:73–6.
- Sierra E, Sánchez S, Saliki JT, Blas-Machado U, Arbelo M, Zucca D, et al. Retrospective study of etiologic agents associated with nonsuppurative meningoencephalitis in stranded cetaceans in the Canary Islands. J Clin Microbiol. 2014;52:2390–7.
- Blanchard TW, Santiago NT, Lipscomb TP, Garber RL, McFee WE, Knowles S. Two novel alphaherpesviruses associated with fatal disseminated infections in Atlantic bottlenose dolphins. J Wildl Dis. 2001;37:297–305.
- Arbelo M, Sierra E, Esperón F, Watanabe TTN, Bellière EN, Espinosa de los Monteros A, et al. Herpesvirus infection with severe lymphoid necrosis affecting a beaked whale stranded in the Canary Islands. Dis Aquat Organ. 2010;89:261–4.
- Soto S, González B, Willoughby K, Maley M, Olvera A, Kennedy S, et al. Systemic herpesvirus and morbillivirus co-infection in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). J Comp Pathol. 2012;146:269–73.
- Bellièr EN, Esperón F, Arbelo M, Muñoz MJ, Fernández A, Sánchez-Vizcaino JM. Presence of herpesvirus in striped dolphins stranded during the cetacean morbillivirus epizootic along the Mediterranean Spanish coast in 2007. Arch Virol. 2010;155:1307–11.
- Babiuk LA, Lawman MJP, Griebel P. Immunosuppression by Bovine herpesvirus 1 and other selected herpesviruses. In: Spector S, Bendinelli M, Friedman H, editors. Virus-induced immunosuppression. New York: Plenum; 1989. p. 141–71.
- Islam AF, Wong CW, Walkden-Brown SW, Colditz IG, Arzey KE, Groves PJ. Immunosuppressive effects of Marek's disease virus (MDV) and herpesvirus of turkeys (HVT) in broiler chickens and the protective effect of HVT vaccination against MDV challenge. Avian Pathol. 2002;31:449–61.
- Flamand L, Gosselin J, Stefanescu I, Ablashi D, Menezes J. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. Blood. 1995;85:1263–71.
- Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-associated immune modulation and its implications for reactivation of latent herpesviruses. In: Glaser R, Jones J, editors. Herpesvirus infections. New York: M Dekker; 1994. p. 245–70.
- Fraja-Fernández N, Crespo-Picazo JL, Domènech F, Míguez-Lozano R, Palacios-Abella JF, Rodríguez-González A, et al. First stranding event of a common minke whale calf, *Balaenoptera acutorostrata* Lacépède, 1804, reported in Spanish Mediterranean waters. Mammal Study. 2015;40.
- Geraci JR, Lounsbury VL. Marine mammals ashore: a field guide for strandings. National Aquarium in Baltimore: Baltimore; 2005.
- VanDevanter DR, Warrenner P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, et al. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. J Clin Microbiol. 1996;34:1666–71.
- Melero M, García-Párraga D, Corpa JM, Ortega J, Rubio-Guerri C, Crespo JL, et al. First molecular detection and characterization of herpesvirus and poxvirus in a Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*). BMC Vet Res. 2014;10:968.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30:2725–9.
- Thompson JD, Plewniak F, Poch O. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. Nucleic Acids Res. 1999;27:2682–90.
- Ogden TH, Rosenberg MS. Multiple sequence alignment accuracy and phylogenetic inference. Syst Biol. 2006;55:314–28.
- Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. New York: Oxford University Press; 2000.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011;28:2731–9.



33. Pellet P, Roizman B. Herpesviridae: a brief introduction. In: Knipe DM, Howley P, editors. *Fields virology*. 5th ed. Pennsylvania: Lippincott; 2007. p. 2480–99.
34. Maness HT, Nollens HH, Jensen ED, Goldstein T, LaMere S, Childress A, et al. Phylogenetic analysis of marine mammal herpesviruses. *Vet Microbiol*. 2011; 149:23–9.
35. Cabello J, Esperón F, Napolitano C, Hidalgo E, Dávila JA, Millán J. Molecular identification of a novel gammaherpesvirus in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*). *J Gen Virol*. 2013;94:2745–9.
36. Speck SH, Ganem D. Viral latency and its regulation: lessons from the gamma-herpesviruses. *Cell Host Microbe*. 2010;8:100–15.
37. Penkert RR, Kalejta RF. Tegument protein control of latent herpesvirus establishment and animation. *Herpesviridae*. 2011;2:3.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

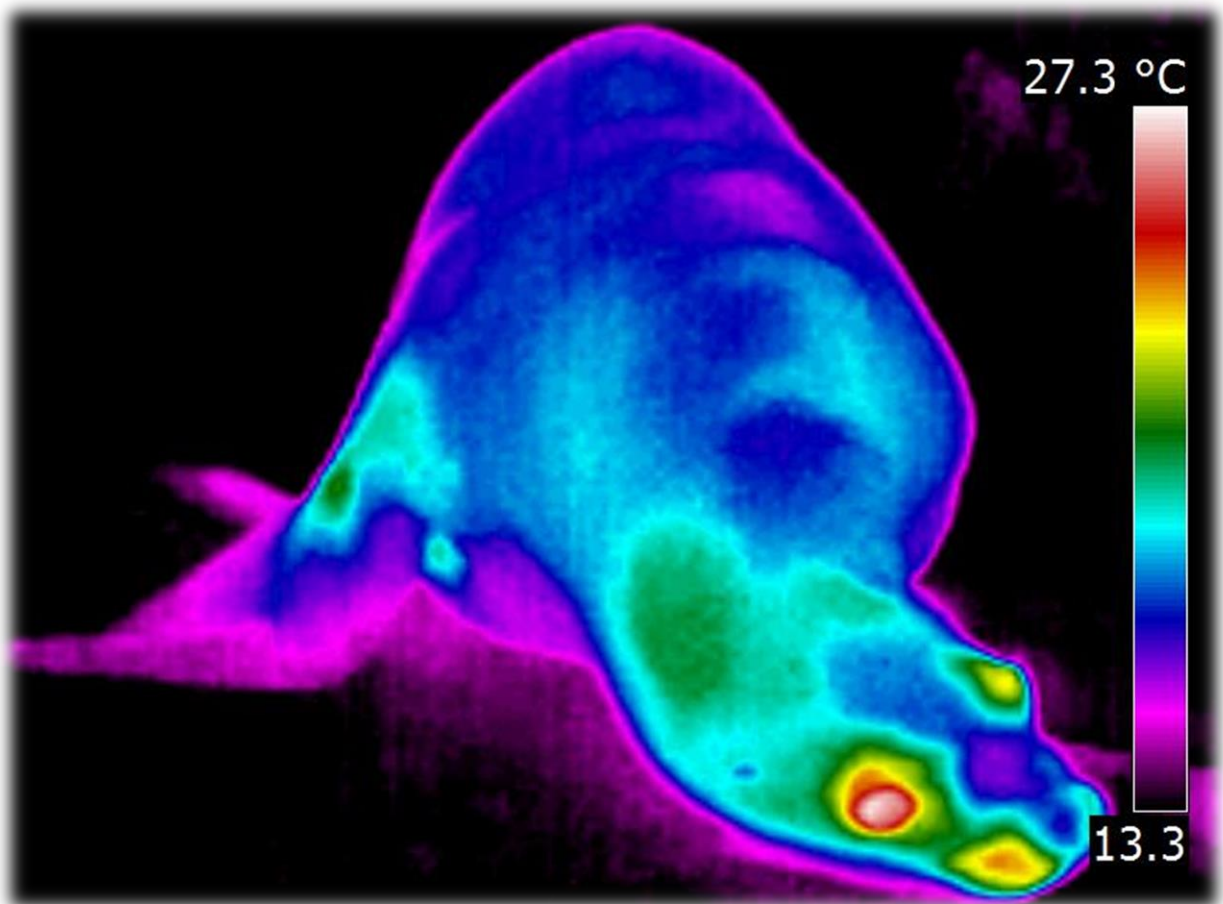
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





## 4. DISCUSIÓN



Fuente de la imagen: Imagen propia.

## DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral se ha abordado el estudio de los mamíferos marinos mediante diferentes herramientas para resolver algunos de los principales problemas que presenta su estudio. Así, se ha aplicado la termografía a la medición a **distancia** de la temperatura, reduciendo el estrés del animal y dando seguridad al técnico. También se ha desarrollado una técnica Luminex® para la determinación de anticuerpos, que permiten **optimizar el volumen de muestra requerido**, ya que esta tecnología puede analizar hasta 100 analitos simultáneamente. El estudio presentado en esta tesis doctoral incluye animales mantenidos en **cautividad** y de **vida libre**, habiéndose evaluado **casos clínicos** de especial interés así como realizado un **estudio amplio**, la determinación sistemática de herpesvirus en la que se han evaluado 966 muestras.

En líneas generales, esta tesis representa un importante avance en la sanidad de los mamíferos marinos, y además ha abierto nuevas líneas de investigación y permitirá ampliar este conocimiento a otras especies y condiciones.

A continuación, se exponen las discusiones de los diferentes objetivos que se han llevado a cabo en esta tesis doctoral.

### 1. Establecer puntos y valores de referencia de la temperatura corporal mediante termografía en mamíferos marinos

Este trabajo muestra la utilidad de la termografía como técnica no invasiva para la evaluación de la temperatura corporal en cetáceos y pinnípedos. Tras medir diferentes puntos anatómicos, aquellos en los que se encontraron valores con menores desviaciones estándar fueron el espiráculo en cetáceos y los ojos en pinnípedos.

En cetáceos, la temperatura del espiráculo medida mediante termografía fue prácticamente igual que la rectal en delfín mular y un grado menor en beluga. Esta similitud entre ambas temperaturas se puede explicar por la profundidad de la mucosa que se mide a través de la apertura del espiráculo, mucho menos expuesta a la temperatura ambiental que otras más externas como la ocular. Por esto mismo, este punto anatómico presenta la ventaja de no necesitar tiempo de estabilización, ya que no se encuentra en contacto con el agua.



Al tomar como referencia termográfica el espiráculo es muy importante tener en cuenta el ángulo en el que se sitúa la cámara respecto al animal y si la respiración es voluntaria o pedida, ya que se encontraron variaciones importantes. Los mejores resultados se obtuvieron situando la cámara perpendicular al eje longitudinal del animal y durante una respiración voluntaria (Figura 10). La importancia de situar la cámara perpendicular al punto que se desea medir se basa en que la radiación infrarroja es emitida en todas direcciones desde una superficie curva, por lo que a distancia no se mide correctamente si el ángulo es grande (McCafferty *et al.*, 2011). Así, Watmough *et al.* (1970) calcularon que el error se incrementa entre 0,5 y 3 °C cuando el ángulo es de 30 a 70 ° y puede ser mayor de 4 °C si se mide en un ángulo mayor de 70 ° (cálculos realizados para una emisividad de 0,98). Por ello, es importante minimizar este error lo máximo posible midiendo lo más perpendicularmente posible, situar el punto de interés en el centro de la imagen y no incluir en el análisis las áreas más externas (Munn *et al.*, 2009). Por otra parte, el espiráculo permanecía más tiempo abierto durante la respiración voluntaria respecto a la pedida por los entrenadores, lo que favorecía una correcta medición de un área más amplia y durante más tiempo.



**Figura 10. Medición de la temperatura en el espiráculo durante una respiración voluntaria en una hembra de beluga (*Delphinapterus leucas*)** [Fuente de la imagen: grupo de termografía SUAT].

Los ojos ya han sido indicados buenos puntos en otras especies (Ng y Kaw, 2006; Purslow y Wolffsohn, 2007; Dunbar *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011). En los cetáceos, aunque el espiráculo fuese un mejor punto de referencia de la temperatura corporal, el ojo también presentó buenos resultados. Por lo que puede ser una buena alternativa en individuos que presenten una lesión o inflamación en la zona del espiráculo o en las vías respiratorias altas que pudieran alterar la medición de la temperatura en este punto.

El tiempo de estabilización de la temperatura superficial es especialmente importante en estos animales por encontrarse en el agua donde, como hemos visto en la introducción, la temperatura se conduce 25 veces más rápido que en el aire. Además, en este trabajo comprobamos que el tiempo necesario para la estabilización fuera del agua es marcadamente menor en el ojo de los cetáceos respecto a los pinnípedos. Esto puede deberse a las diferencias anatómicas y fisiológicas que diferencian sus ojos, ya que los de los cetáceos cuentan con plexos vasculares muy desarrollados (Mass y Supin, 2007; Ninomiya y Yoshida, 2007) que podrían compensar en cierta medida la pérdida de temperatura en el agua.

En las especies estudiadas, una vez estabilizada la temperatura ocular se observaron fluctuaciones siempre menores de 0,8 °C. Estas variaciones se consideraron pequeñas teniendo en cuenta las investigaciones de Morgan *et al.* (1993) que establecieron 0,62 °C como la máxima diferencia entre ambos ojos de una persona sin patologías oculares, para el 95% de la población humana. Ampliando el estudio realizado en pinnípedos a un mayor número de individuos será posible establecer el límite exacto en estas especies.

Las diferencias encontradas en función del género y la edad en algunas de las especies fueron todas ellas en la misma dirección. Así, los machos presentaron valores de temperatura mayores que las de las hembras en león marino de la Patagonia, foca común y delfín mular. En función de la edad, los adultos obtuvieron valores de temperatura más altos que las crías en león marino de la Patagonia y foca común (las dos especies en que se pudo valorar). Sin embargo, es necesario ampliar el número de animales estudiados para poder evaluar estas diferencias y su significación estadística.

Por otra parte, en la aplicación de la termografía a los mamíferos marinos si bien resulta fundamental monitorizar la temperatura corporal de los animales y sus variaciones, es esencial también conocer el patrón térmico de cada especie. Así, podremos también estudiar las alteraciones localizadas al evaluar las variaciones de este patrón y la simetría entre estructuras bilaterales, esenciales en la evaluación clínica de humanos y animales (Morgan *et al.*, 1993; Jones, 1998; Mabuchi *et al.*, 1998; Melero *et al.*, 2013).

En este sentido, la termografía ha sido aplicada al estudio del patrón térmico de los mamíferos marinos así como de las ventanas térmicas como mecanismo de termorregulación.

Así, Mauck *et al.* (2003) estudiaron mediante termografía ejemplares de foca de Groenlandia (*Pagophilus groenlandica*), foca común del Atlántico oriental (*Phoca vitulina vitulina*) y foca gris; y Rodríguez-Prieto *et al.* (2013) estudiaron el patrón y las ventanas térmicas en morsa del Pacífico. La aparición de dichas ventanas dificultó la evaluación de la temperatura en la zona de las vibrisas el estudio descrito en esta tesis. Frecuentemente la aparición de ventanas en esta región modificaba marcadamente su temperatura de forma irregular. Por ello, esta zona se desestimó como punto de referencia de la temperatura corporal.

La aplicación de la termografía a la monitorización de la temperatura corporal en mamíferos marinos es especialmente interesante en individuos de libertad, aquellos sin entrenamiento previo y crías, puesto que puede realizarse a distancia, reduciendo el estrés del animal y dando seguridad al técnico. Además, permite evaluar un gran número de animales en poco tiempo y a bajo coste. En el futuro, sería muy interesante analizar un número mayor de animales, individuos con hipo- e hipertermia y en diferentes condiciones ambientales, especialmente en sus hábitats naturales.

## 2. Estudiar la patología producida por *Erysipelothrix rhusiopathiae* en cetáceos en libertad y mejorar las herramientas de detección de anticuerpos frente a esta bacteria

La técnica Luminex® diseñada para la determinación de anticuerpos frente a *E. rhusiopathiae* fue validada con muestras de delfines mulares vacunados a diferentes tiempos entre revacunaciones y ejemplares sin vacunar. Además, resultó útil en la valoración de la pérdida de inmunidad entre revacunaciones y en su aplicación a muestras a tres especies de cetáceos de vida libre: delfín listado, calderón gris y delfín mular.

En el desarrollo de esta técnica se utilizó proteína A de *Staphylococcus aureus* como anticuerpo secundario. Pese a que normalmente se prefiere la utilización de anticuerpos específicos frente a los de la especie a estudiar, en el caso de los cetáceos la oferta de anticuerpos específicos es muy escasa (Nollens *et al.*, 2007; Bernal-Guadarrama *et al.*, 2014a). Por ello, se eligió la proteína A, que pese a no ser tan específica para el delfín mular como lo serían anticuerpos específicos comerciales, iguala en cierta forma la técnica en todas las especies a evaluar. Estudios anteriores ya reportan la utilización con éxito de la proteína A en

la determinación de anticuerpos en cetáceos (Lindmark *et al.*, 1983; Duignan *et al.*, 1995a; Jepson *et al.*, 1997; Van Bressem *et al.*, 1998).

La presencia de anticuerpos fue determinada en las muestras de suero de todos los delfines mulares vacunados, disminuyendo su cantidad (proporcional a la intensidad de la fluorescencia) en casi todos ellos durante el periodo entre revacunaciones. La vacunación frente a esta bacteria en cetáceos en cautividad es un tema controvertido, debido a los posibles efectos secundarios y diferentes resultados obtenidos con las diversas vacunas disponibles. Sin embargo, la vacunación es frecuente en los delfinarios ya que se ha asociado al descenso de los casos clínicos (Lacave *et al.*, 2001; Sitt *et al.*, 2010; Bernal-Guadarrama *et al.*, 2014b). Sitt *et al.* (2010) compararon la respuesta inmune obtenida con la vacuna ER Bac Plus® (Pfizer Animal Health, Exton, EE.UU.) al seguir un programa de revacunación cada 6 o cada 12 meses. Concluyeron que lo más apropiado era revacunar cada 12 meses. Esta vacuna es la misma que se administró a los delfines analizados con Luminex®, exceptuando al animal 1, siguiendo un calendario de revacunación anual.

Un estudio realizado por Bernal-Guadarrama *et al.* (2014b) describe el desarrollo de una técnica de inmunofluorescencia indirecta mediante la que analizaron muestras de suero de dos delfinarios. Determinaron anticuerpos en todos los delfines de Loro Parque (vacunados con ER Bac Plus®) pero no en la mayoría de los del Oceanogràfic [vacunados entonces con ERYSORB PLUS® (Vetoquinol Especialidades Veterinarias, Madrid, España)]. Las muestras analizadas por Bernal-Guadarrama *et al.* (2014b) databan de 2007 y 2008 principalmente, siendo muy posteriores las evaluadas en esta tesis. Únicamente cuatro de los delfines son comunes a ambos estudios. Mientras que Bernal-Guadarrama *et al.* (2014b) sólo determinaron anticuerpos en dos de ellos, en nuestro estudio lo hicimos en los cuatro. Esta diferencia puede deberse al cambio de vacuna utilizada por el centro entre ambos estudios, puesto que sí detectaron anticuerpos en todos los delfines vacunados con ER Bac Plus®.

Aunque no se conoce la cantidad de anticuerpos que producen protección eficaz frente a una infección en estos animales, mediante la tecnología Luminex® pudimos determinar anticuerpos 12 meses después de la revacunación en 9 de los 10 delfines estudiados. Este resultado, junto con los de Sitt *et al.* (2010) y Bernal-Guadarrama *et al.*

(2014b), y la ausencia de casos clínicos, apoyan la eficacia de esta vacuna (ER Bac® Plus de Pfizer) y la revacunación cada 12 meses.

Tras el desarrollo y validación de esta técnica, en su aplicación a 15 cetáceos varados vivos se incluyeron muestras de suero, líquido pericárdico y leche del delfín mular varado cuyo caso clínico se incluye en este mismo objetivo.

Este animal, una hembra de delfín mular adulta, mostraba las lesiones romboidales que son patognomónicas de erisipela en diversas especies (Wang *et al.*, 2010). Los resultados del análisis de sangre realizado mostraban leucocitosis caracterizada por neutrofilia, indicando que la infección era relativamente reciente. Los principales hallazgos durante la necropsia y el análisis histopatológico principales fueron congestión y bacterias intravasculares multisistémicas y reacción inflamatoria asociada. Además, se aisló *E. rhusiopathiae* a partir de muestras de piel y cerebro. El diagnóstico de la causa de la muerte fue septicemia por *E. rhusiopathiae*, en base a los hallazgos descritos, similares a los reportados en otros casos de erisipela en cetáceos (Seibold y Neal, 1956; Geraci *et al.*, 1966; Thurman *et al.*, 1983; Kinsel *et al.*, 1997; Díaz-Delgado *et al.*, 2015)

La determinación de anticuerpos frente a *E. rhusiopathiae* mediante la tecnología Luminex® fue negativa en todas las muestras de este animal. La falta de anticuerpos podría deberse a un proceso de inmunosupresión, ya que varios artículos han reportado que la infección puede progresar muy rápidamente en individuos inmunocomprometidos de otras especies de mamíferos y en humanos (Sawada *et al.*, 1987; Foster *et al.*, 2012; Sinclair *et al.*, 2013). Aunque esta explicación parece poco probable, ya que este animal presentaba leucocitosis, con una marcada neutrofilia. Teniendo en cuenta los resultados y que previamente se ha descrito la rápida evolución de esta enfermedad desde un animal asintomático a morir en menos de 24 horas (Waltzek *et al.*, 2012); la causa más probable de la falta de anticuerpos frente a la bacteria parece ser una rápida evolución de la septicemia sin tiempo suficiente para que el delfín produjese anticuerpos específicos.

Por el contrario, en uno de los calderones grises analizados sí se determinaron anticuerpos con un valor de fluorescencia muy similar a la media de los delfines mulares 12 meses después de la vacunación. Sin embargo, en los análisis histopatológicos y



bacteriológicos de este animal no se obtuvieron hallazgos indicativos de que estuviese teniendo lugar una infección por *E. rhusiopathiae* en el momento de la muerte. Al evaluar los resultados en conjunto, la explicación más probable a la presencia de anticuerpos específicos en el suero de este animal parece ser que el calderón estuvo en contacto con la bacteria, pudiendo haber sufrido la enfermedad meses antes del varamiento y haberse repuesto. La causa del varamiento y de la muerte del animal no ha podido esclarecerse. Una hipótesis, basada en el hallazgo de secreción y parásitos en los senos pterigoideos y el área timpánica, es que su presencia dificultase la ecolocalización, disminuyendo así la capacidad del animal para alimentarse, produciendo su debilitamiento.

Como vimos en la introducción, la erisipela es una enfermedad de gran importancia en cetáceos tanto de cautividad como de vida libre. El estudio de los animales varados aporta una valiosa información sobre las poblaciones en libertad, tanto desde el punto de vista de la presencia de anticuerpos como de los casos clínicos.

El estudio de esta enfermedad en cetáceos de vida libre tiene un especial interés ya que un aumento en la aparición de casos clínicos podría relacionarse con una mayor presión sobre las poblaciones por actividades como la pesca o el tráfico marítimo. El estrés y la competencia por los recursos pueden hacer más sensibles a estos animales a las infecciones. Además, al ser una enfermedad que afecta a numerosas especies, es importante tener en cuenta la posibilidad de la transmisión desde los animales terrestres, como sugirieron Bowater *et al.* (2003) en el caso de cuatro delfines jorobados del Pacífico (*Sousa chinensis*) infectados con *Toxoplasma gondii* que vararon tras episodios de fuertes precipitaciones.

Por otra parte, la descrita en esta tesis doctoral es la primera aplicación de la tecnología Luminex® a los cetáceos. La técnica desarrollada resulta útil en sí misma, para la determinación de anticuerpos frente a *E. rhusiopathiae*, y también como primer paso para el desarrollo de la detección simultánea de varios analitos en un protocolo *multiplex*.

### 3. Analizar la presencia de diferentes virus en mamíferos marinos de cautividad y de vida libre

La determinación y amplificación de una secuencia de herpesvirus en **morsa** descrita en esta tesis fue la primera en un ejemplar del género *Odobenus*. Sin embargo, en un estudio

previo Zarnke *et al.* (1997) evaluaron la presencia de anticuerpos frente a *phocine herpesvirus* 1 (PhHV-1) y 2 (PhHV-2) en morsas de Alaska y Rusia, obteniendo que el 55,42% (189/341) de los animales presentaban anticuerpos frente a PhHV-1, el 28,74% (98/341) frente a PhHV-2 y el 17,89% (61/341) frente a ambos virus, siendo sólo el 33,72% (115/341) negativos para ambas determinaciones. Ambos estudios en conjunto muestran la importancia que podría tener herpesvirus en las morsas y el interés de su evaluación.

En el caso descrito en esta tesis se evaluó la presencia de IgG e IgM frente a herpesvirus canino, tanto en el caso clínico como en las demás morsas con las que convivía. Todas las muestras fueron negativas a la presencia de IgG y sólo las del caso clínico fueron positivas a IgM. Teniendo en cuenta estos resultados, la infección por herpesvirus parecía estar en un estadio inicial, ya que IgM es la inmunoglobulina cuya producción se induce primero durante una infección y dado que aún no se había producido IgGs.

El hecho de amplificar una secuencia muy cercana filogenéticamente a *cetaceanpoxvirus 1* en la morsa sugería que el origen del virus podría estar en las belugas con las que la morsa comparten edificio. Aunque no tiene contacto directo y el agua proviene de sistemas separados, los entrenadores son los mismos, pudiendo haber actuado como vectores mecánicos en la transmisión del virus entre las dos especies. Este proceso podría verse favorecido por la gran capacidad de poxvirus para sobrevivir en el medio durante largos periodos de tiempo (Harper, 1961; Kennedy-Stoskopf, 2001; Wood *et al.*, 2013), lo que favorece el riesgo de su diseminación vía fómites. Para evaluar esta hipótesis se analizaron muestras de piel sana y con lesiones y de sangre de las belugas e hisopos orales de los entrenadores, siendo todas negativas. Estos resultados no confirman la hipótesis pero tampoco permiten descartarla, ya que los animales han compartido edificio durante casi ocho años y en este estudio sólo han podido evaluarse muestras en un momento concreto, pudiendo haber tenido lugar la transmisión mucho tiempo antes.

En el estudio de herpesvirus en el **rorcual común** y el **rorcual aliblanco**, no se pudo realizar el análisis histopatológico ni determinar la presencia de ARN debido al avanzado estado de descomposición de ambos animales. La presencia de herpesvirus en mucosa genital, sistema nervioso y piel puede limitar la reproducción y causar encefalitis. Sin embargo,

también puede estar presente sin producir lesión o en periodo de latencia. Aunque la sola determinación del virus en los tejidos no permite asociarlo con ningún tipo de lesión, demuestra que herpesvirus puede infectar a miembros del género *Balaenoptera* y que deber ser tenido en cuenta al realizar estudios virológicos en estas especies.

El estudio de casos clínicos como estos es importante, sobre todo en especies de difícil acceso y especies en peligro, como el rorcual común (IUCN, 2016). Permite el descubrimiento y la descripción de nuevos agentes y enfermedades. Sin embargo, también es fundamental el estudio de un gran número de muestras y animales que permitan entender mejor las enfermedades.

En esta tesis se describe el primer **estudio sistemático de determinación de herpesvirus en todas las muestras de cetáceos varados durante tres años**, realizado con el objetivo de entender mejor la relación entre el virus y los cetáceos. La prevalencia encontrada (80,85%) es la más alta reportada en mamíferos marinos (Bellière *et al.*, 2010; Buckles *et al.*, 2007; Goldstein *et al.*, 2006a), pudiendo deberse a que este estudio es el que más tejidos muestrea. Así, un estudio previo en delfines listados varados en el Mar Mediterráneo realizado por Bellière *et al.* (2010) encontró que el 62,5% (5/8) de los delfines estudiados fueron positivos evaluando entre 2 y 8 tejidos por animal.

Al mismo tiempo, la prevalencia en nuestros análisis pudo estar subestimada, ya que en cinco de los nueve animales negativos sólo se pudieron evaluar entre 4 y 7 tejidos. Esta cifra es muy inferior a la media general que fue de 20,55 tejidos evaluados por individuo, por lo que no se puede descartar que el hecho de que estos animales fueran negativos se deba al escaso número de tejidos analizados. Gracias a este amplio muestreo, analizando más allá de los tejidos que pudieran presentar lesiones compatibles, se descubrió que la mayoría de los animales infectados lo estaban en más de un tejido, habiendo replicación viral en aproximadamente la mitad de los tejidos.

Los sistemas en los que mayor proporción de tejidos positivos se determinaron son los mismos en los que más artículos han reportado herpesvirus en cetáceos previamente: **reproductor** (Blanchard *et al.*, 2001; Saliki *et al.*, 2006; Smolarek Benson *et al.*, 2006; van Elk *et al.*, 2009; Rehtanz *et al.*, 2012; Lecis *et al.*, 2014; Bellehumeur *et al.*, 2015; Sierra *et*

*al.*, 2015; van Elk *et al.*, 2016), **nervioso** (Kennedy *et al.*, 1992; Esperón *et al.*, 2008; Sierra *et al.*, 2014; van Elk *et al.*, 2016) y **tegumento** (Martineau *et al.*, 1988; Barr *et al.*, 1989; Van Bresse *et al.*, 1994; Blanchard *et al.*, 2001; Manire *et al.*, 2006; Smolarek Benson *et al.*, 2006; Hart *et al.*, 2012; Sierra *et al.*, 2014; van Beurden *et al.*, 2015). De forma similar, en el rorcual común y el aliblanco se determinó herpesvirus en mucosa genital, sistema nervioso central y piel, pertenecientes a estos sistemas.

En los tres estudios presentados en este objetivo el análisis filogenético de las secuencias del gen que codifica la ADN polimerasa de los herpesvirus amplificados incluyó su comparación con los registrados en distintas bases de datos. Los más parecidos eran virus determinados en pinnípedos en el caso de la **morsa**, y en cetáceos en el de los **rorcuales** y la **determinación sistemática** en los cetáceos varados durante tres años. Estos resultados están en concordancia con otros artículos que apuntan que la relación filogenética entre los miembros de la familia *Herpesviridae* se asemeja a la de sus hospedadores, lo que podría revelar un fenómeno de coevolución entre el hospedador y el virus (Maness *et al.*, 2011; Cabello *et al.*, 2013; Pellet y Roizman, 2013).

En la determinación sistemática de herpesvirus, al valorar los resultados en función del género, la presencia de herpesvirus fue mayor en hembras, especialmente en los sistemas nervioso, urinario, endocrino y reproductor. La falta de estudios similares en cetáceos no nos permite compararlos, aunque sí con otros realizados en pinnípedos. De forma similar, estudios previos encontraron mayor prevalencia en hembras al analizar la presencia de herpesvirus en hisopos nasales en foca monje de Hawái (Goldstein *et al.*, 2006a), y al analizar la presencia de anticuerpos frente a herpesvirus en suero de hembras de foca común y de león marino de Steller (Zarnke *et al.*, 1997). Por el contrario, al evaluar la presencia de herpesvirus en hisopos de urogenital de león marino de California, Buckles *et al.* (2007) hallaron una mayor prevalencia en machos.

En relación a la edad, los resultados de este estudio mostraron una mayor prevalencia en juveniles y crías, encontrando la más baja en neonatos. Goldstein *et al.* (2006a) obtuvieron resultados similares en foca monje de Hawái donde la proporción de muestras positivas más alta la presentaron los subadultos y la más baja las crías más jóvenes (Goldstein *et al.*, 2006a). Zarnke *et al.* (1997) encontraron una correlación positiva entre la edad de las morsas y la

probabilidad de tuvieran anticuerpos frente a herpesvirus. Esta tendencia es parcialmente similar a la observada en nuestro estudio, excepto porque la prevalencia de herpesvirus fue menor en adultos que en juveniles, tanto a nivel de individuos como de muestras de tejidos.

Los neonatos fueron el grupo de edad con la prevalencia más baja pero con la mayor proporción de tejidos positivos con replicación activa. Esto puede deberse a que los procesos de infección eran más recientes y no se habían establecido tantos procesos latentes o reflejar una menor inmunocompetencia respecto a animales de mayor edad.

En este estudio, asumimos que la presencia de ARN con la secuencia de herpesvirus indicaba replicación viral, asumiendo que su ausencia se debía a una infección latente. En este sentido es interesante destacar que ARN con la secuencia de herpesvirus sólo se encontró en el 37,05% (12/32) de los tejidos positivos del sistema nervioso. Estos resultados están en concordancia con la habilidad de herpesvirus para mantener infecciones latentes en las neuronas que pueden durar toda la vida (Speck y Ganem, 2010; Penkert y Kalejta, 2011). Sin embargo, la falta de ARN con la secuencia de herpesvirus no es estrictamente una prueba de una infección latente, ya que también puede deberse a una infección abortiva, en un estadio muy temprano, o a que la cantidad de ARN sea demasiado baja para detectarla. Sería interesante seguir estudiando la latencia de herpesvirus en cetáceos, diseñando técnicas de PCR específicas más sensibles que permitan detectar un número muy pequeño de copias de ARN, así como evaluarlo en un mayor número de tejidos, individuos y especies.

Aunque actualmente no hay estudios similares en cetáceos, sería de gran interés comprar los resultados obtenidos en el Mediterráneo con otros estudios en distintas partes del mundo y en diferentes especies. Así mismo, determinando periódicamente la prevalencia de herpesvirus y su replicación en los cetáceos varados en la costa valenciana, y evaluando los cambios que pudieran producirse, podremos obtener una valiosa información acerca del estado sanitario de las poblaciones y, en su papel de centinelas, de la salud del ecosistema marino.

#### 4. Perspectivas y líneas de futuro

Es importante destacar que el estudio de la sanidad de los mamíferos marinos resulta de gran interés en sí mismo, pero también, como ha sido expuesto al comienzo de esta tesis, como **centinelas de la salud de los ecosistemas marinos** y por **salud pública**, debido al



estrecho contacto que mantienen los animales en cautividad con sus cuidadores y, en algunos casos, con el público. Lo que otorga mayor relevancia e interés a su estudio.

Esta tesis doctoral presenta avances en la sanidad de los mamíferos marinos tanto desde el punto de vista de la monitorización y la detección temprana, como en el desarrollo de técnicas diagnósticas y el estudio de virus y bacterias que les afectan. Además, abre nuevas líneas de estudio.

De forma concreta, a partir de los resultados presentados en esta tesis, el estudio de la temperatura corporal a distancia mediante **termografía** puede ampliarse a nuevas especies, condiciones y a la valoración de diversas patologías. Mediante la tecnología **Luminex** desarrollada, se puede determinar de forma rápida, utilizando poca muestra y con gran sensibilidad, la presencia de anticuerpos frente a *Erysipelothrix rhusiopathiae* en cetáceos. En aquellos de vida libre es especialmente interesante ahondar en el estudio del posible contacto previo entre los animales y el patógeno y en los individuos de cautividad, el estudio de las diferentes vacunas, su eficacia y duración de la inmunidad producida. Además, a partir de esta técnica pueden diseñarse nuevas determinaciones e incluirlas en un protocolo *multiplex* que permita detectar numerosos analitos reduciendo la muestra necesaria. Habiendo determinado herpesvirus en dos especies de **rorcuales**, este virus debe ser tenido en cuenta en futuros estudios virológicos en estas especies, así como herpesvirus y poxvirus en la **morsa**. Por otra parte, la determinación sistemática de **herpesvirus** en los cetáceos varados en la Comunidad Valenciana, constituye un precedente sobre el que puede elaborarse un estudio a largo plazo o comparativo entre diversas áreas geográficas y/o especies.

Pero además, de forma general, en el estudio de la sanidad de los mamíferos marinos existen numerosas líneas de investigación abiertas y de gran interés. Resulta especialmente relevante ampliar los estudios actuales a **grandes grupos** de animales que permitan conocer las características propias de cada **especie**, **género** y grupo de **edad**. También es necesario desarrollar y aplicar nuevas técnicas específicas que permitan conocer más sobre los **patógenos** que les afectan, la **interacción** entre los mismos, su **patogenia**, **vías de transmisión** y la **respuesta inmune** que inducen. Especialmente de aquellos con potencial **zoonótico**.

## 5. CONCLUSIONES



Fuente de la imagen: [www.flickr.com](http://www.flickr.com); Autor: Northwest Power and Conservation Council.

## CONCLUSIONES

1. La termografía es una herramienta útil y no invasiva para la monitorización de la temperatura corporal en mamíferos marinos. En cetáceos, el mejor punto de referencia es el espiráculo medido perpendicularmente durante una respiración voluntaria. En pinnípedos, el mejor punto de referencia es el ojo tras un tiempo de estabilización de la temperatura tras salir del agua.
2. Se ha descrito el primer caso de septicemia aguda por *Erysipelothrix rhusiopathiae* en un delfín mular varado.
3. La técnica Luminex® desarrollada para la determinación de anticuerpos frente a *E. rhusiopathiae* en cetáceos es la primera aplicación de esta tecnología a los mamíferos marinos, habiéndose utilizado en delfines listados, calderones grises y un delfín mular de vida libre y en delfines mulares de cautividad.
4. Se ha determinado por primera vez herpesvirus en miembros del género *Balaenoptera*. En concreto, nuevos alfa y gammaherpesvirus se amplificaron a partir de muestras de un rorcual común y un rorcual aliblanco, respectivamente.
5. Se ha descrito por primera vez la determinación de un nuevo gammaherpesvirus y de *cetaceanpoxvirus* 1 en una morsa del Pacífico, siendo también la primera descripción de estos virus en un ejemplar del género *Odobenus*.
6. La prevalencia de herpesvirus en los cetáceos varados en la Comunidad Valenciana entre junio de 2010 y junio de 2013 fue del 80,85% de los animales y el 12,53% de los tejidos, evidenciándose replicación viral en el 50,47% de los tejidos positivos. El sistema con mayor proporción de muestras positivas el reproductor, seguido del nervioso y el tegumento. Las hembras, así como las crías y juveniles, mostraron mayor presencia de herpesvirus, siendo en los neonatos donde se encontró un mayor porcentaje de tejidos con replicación viral.





## 6. BIBLIOGRAFÍA



Fuente de la imagen: [FreeImages.com/Santiago Masquelet](https://www.freeimages.com/photo/2148488).

## BIBLIOGRAFÍA

- Akers, T.G., Smith, A.W., Latham, A.B., Watkins, H.M. (1974). Calicivirus antibodies in California gray whales (*Eschrichtius robustus*) and Steller sea lions (*Eumetopias jupatus*). *Arch Gesamte Virusforsch*, 46(1-2): 175-177.
- Alba, P., Terracciano, G., Franco, A., Lorenzetti, S., Cocumelli, C., Fichi, G., Eleni, C., Zygmunt, M. S., Cloeckert, A., Battisti, A. (2013). The presence of *Brucella ceti* ST26 in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) with meningoencephalitis from the Mediterranean Sea. *Vet Microbiol*, 164 (1-2): 158-163.
- Alegre, F., Alonso, J.M., Degollada, E., Domingo, M., López, A., Tello M. (1996). Nocardiosis in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). En *3th ECS Workshop Cetacean Pathology: Lung pathology*. Lisboa.
- Amalu, W.C., Hobbins, W.B., Head, J.F., Elliot, R.L. (2006). Infrared imaging of the breast - An overview. En *The Biomedical Engineering Handbook. Third edition. Vol. 2: Medical Devices and Systems*. (J.D. Bronzino, Ed.), pp. 25.1-25.20. CRC Press, Boca Raton.
- Ammer, K. (2006). Diagnosis of Raynaud's phenomenon by thermography. *Skin Res Tech*, 2(4): 182-185.
- Anderson, S., Wakeley, P., Wibberley, G., Webster, K., Sawyer, J. (2011). Development and evaluation of a Luminex multiplex serology assay to detect antibodies to bovine herpes virus 1, parainfluenza 3 virus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus, with comparison to existing ELISA detection methods. *J Immunol Methods*, 366(1-2): 79-88.
- Anthony, S.J., St Leger, J.A., Pugliares, K., Ip, H.S., Chan, J.M., Carpenter, Z.W., Navarrete-Macias, I., Sanchez-Leon, M., Saliki, J.T., Pedersen, J., Karesh, W., Daszak, P., Rabadan, R., Rowles, T., Lipkin, W.I. (2012). Emergence of fatal avian influenza in New England harbor seals. *MBio*, 3(4): e00166-12.
- Arbelo, M., Sierra, E., Esperón, F., Watanabe, T.T., Bellière, E.N., Espinosa de los Monteros, A., Fernández, A. (2010). Herpesvirus infection with severe lymphoid necrosis affecting a beaked whale stranded in the Canary Islands. *Dis Aquat Organ*, 89(3): 261-264.
- Arbelo, M., Bellière, E.N., Sierra, E., Sacchinni, S., Esperón, F., Andrada, M., Rivero, M., Díaz-Delgado, J., Fernández, A. (2012). Herpes virus infection associated with interstitial nephritis in a beaked whale (*Mesoplodon densirostris*). *BMC Vet Res*, 8: 243.
- Arbelo, M., Espinosa de los Monteros, A., Herráez, P., Andrada, M., Sierra, E., Rodríguez, F., Jepson, P.D., Fernández, A. (2013). Pathology and causes of death of stranded cetaceans in the Canary Islands (1999-2005). *Dis Aquat Organ*, 103(2): 87-99.
- Armstrong, D.G., Lavery, L.A., Liswood, P.J., Todd, W.F., Tredwell, J.A. (1997). Infrared dermal thermometry for the high-risk diabetic foot. *Phys Ther*, 77(2): 169-175.

- Aschfalk, A., Folkow, L., Rud, H., Denzin, N. (2002). **Apparent seroprevalence of *Salmonella* spp. in harp seals in the Greenland Sea as determined by enzyme-linked immunosorbent assay.** *Vet Res Commun*, 26(7): 523-530.
- Avalos-Téllez, R., Suárez-Güemes, F., Carrillo-Casas, E.M., Hernández-Castro, R. (2010). **Bacteria and yeast normal microbiota from respiratory tract and genital area of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*).** En *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. (A. Méndez-Vilas), pp. 666-673. Formatex Research Center, Badajoz.
- Aweda, M.A., Ketiku, K.K., Ajekigbe, A.T., Edi, A.A. (2010). **Potential role of thermography in cancer management.** *Arch Appl Sci Res*, 2: 300-312.
- Babiuk, L.A., Lawman, M.J.P., Griebel, P. (1989). **Immunosuppression by bovine herpesvirus 1 and other selected herpesviruses.** En *Virus-induced immunosuppression*. (S. Spector, M. Bendinelli, H. Friedman, Eds.), pp. 141-171. Plenum, New York.
- Bachovchin, D.A., Koblan, L.W., Wu, W., Liu, Y., Li, Y., Zhao, P., Woznica, I., Shu, Y., Lai, J.H., Poplawski, S.E., Kiritsy, C.P., Healey, S.E., DiMare, M., Sanford, D.G., Munford, R.S., Bachovchin, W.W., Golub, T.R. (2014). **A high-throughput, multiplexed assay for superfamily-wide profiling of enzyme activity.** *Nat Chem Biol*, 10(8): 656-663.
- Bagavathiappan, S., Saravanan, T., Philip, J., Jayakumar, T., Raj, B., Karunanithi, R., Panicker, T., Korath, M.P., Jagadeesan, K. (2009). **Infrared thermal imaging for detection of peripheral vascular disorders.** *J Med Phys*, 34(1): 43-47.
- Bagavathiappan, S., Philip, J., Jayakumar, T., Raj, B., Rao, P.N.S., Varalakshmi, M., Mohan, V. (2010). **Correlation between plantar foot temperature and diabetic neuropathy by using an infrared thermal imaging technique.** *J Diabetes Sci Technol*, 4(6): 1386-1392.
- Baker, J.R. (1992). **Causes of mortality and parasites and incidental lesions in dolphins and whales from British waters.** *Vet Rec*, 130(26): 569-572.
- Baker, J.R., Martin, A.R. (1992). **Causes of mortality and parasites and incidental lesions in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from British waters.** *Vet Rec*, 130(25): 554-558.
- Baker, H.N., Murphy, R., Lopez, E., Garcia, C. (2012). **Conversion of a capture ELISA to a Luminex xMAP assay using a multiplex antibody screening method.** *J Vis Exp*, 65: 4084.
- Baker, K.S., Murcia, P.R. (2014). **Poxviruses in bats ... so what?.** *Viruses*, 6(4): 1564-1577.
- Balasuriya, U.B., Shi, P.Y., Wong, S.J., Demarest, V.L., Gardner, I.A., Hullinger, P.J., Ferraro, G.L., Boone, J.D., De Cino, C.L., Glaser, A.L., Renshaw, R.W., Ledizet, M., Koski, R.A., MacLachlan, N.J. (2006). **Detection of antibodies to West Nile virus in equine sera using microsphere immunoassay.** *J Vet Diagn Invest*, 18(4): 392-395.

- Balbinot, L.F., Canani, L.H., Robinson, C.C., Achaval, M., Zaro, M.A. (2012). **Plantar thermography is useful in the early diagnosis of diabetic neuropathy.** *Clinics (Sao Paulo)*, 67(12): 1419-1425.
- Baldini, A., Nota, A., Cioffi, C., Ballanti, F., Cozza, P. (2015). **Infrared thermographic analysis of craniofacial muscles in military pilots affected by bruxism.** *Aerosp Med Hum Perform*, 86(4): 374-378.
- Barbieri, M.M., McLellan, W.A., Wells, R.S., Blum, J.E., Hofmann, S., Gannon, J., Pabst, D.A. (2010). **Using infrared thermography to assess seasonal trends in dorsal fin surface temperatures of free-swimming bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Sarasota Bay, Florida.** *Mar Mamm Sci*, 26(1): 53-66.
- Barlough, J.E., Matson, D.O., Skilling, D.E., Berke, T., Berry, E.S., Brown, R.F., Smith, A.W. (1998). **Isolation of reptilian calicivirus *Crotalus* type 1 from feral pinnipeds.** *J Wildl Dis*, 34(3): 451-456.
- Barnett, J., Dastjerdi, A., Davison, N., Deaville, R., Everest, D., Peake, J., Finnegan, C., Jepson, P., Steinbach, F. (2015). **Identification of novel cetacean poxviruses in cetaceans stranded in South West England.** *PLoS One*, 10(6): e0124315.
- Barr, B., Dunn, J.L., Daniel, M.D., Banford, A. (1989). **Herpes-like viral dermatitis in a beluga whale (*Delphinapterus leucas*).** *J Wildl Dis*, 25(4): 608-611.
- Basile, A.J., Biggerstaff, B.J., Kosoy, O.L., Junna SR, Panella NA, Powers AM, Stark LM, Nemeth NM. (2010) **Removal of species constraints in antibody detection.** *Clin Vaccine Immunol*, 17(1): 56-61.
- Bastida, R., Loureiro, J., Quse, V., Bernadelli, A., Rodriguez, D., Costa, E. (1999). **Tuberculosis in a wild subantarctic fur seal from Argentina.** *J Wildl Dis*, 35(4): 796-798.
- Bauwensn, L., Van Dyck, W., De Meurichy, D., Piot, P. (1987). ***Corynebacterium equi* pneumonia in three Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*).** *Aquat Mamm*, 13: 17-22.
- Becher, P., König, M., Müller, G., Siebert, U., Thiel, H.J. (2002). **Characterization of sealpox virus, a separate member of the parapoxviruses.** *Arch Virol*, 147(6): 1133-1140.
- Beck, C., Desprès, P., Paulous, S., Vanhomwegen, J., Lowenski, S., Nowotny, N., Durand, B., Garnier, A., Blaise-Boisseau, S., Guitton, E., Yamanaka, T., Zientara, S., Lecollinet, S. (2015). **A high-performance multiplex immunoassay for serodiagnosis of flavivirus-associated neurological diseases in horses.** *Biomed Res Int*, 2015: 678084.
- Beckmen, K.B., Nolan, S. (1994). **Salmonella serotypes in pinnipeds at a rehabilitation center.** En *Proc 25th Annu Workshop Int Assoc Aquat Anim Med*, 162.
- Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F., Baumgartner, W. (2009). **Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper.** *Vet Immunol Immunopathol*, 127(1-2): 1-18.



- Bellehumeur, C., Lair, S., Romero, C.H., Provost, C., Nielsen, O., Gagnon, C.A. (2015). **Identification of a novel herpesvirus associated with a penile proliferative lesion in a beluga (*Delphinapterus leucas*).** *J Wildl Dis*, 51(1): 244-249.
- Bellière, E.N., Esperón, F., Arbelo, M., Muñoz, M.J., Fernández, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2010). **Presence of herpesvirus in striped dolphins stranded during the cetacean morbillivirus epizootic along the Mediterranean Spanish coast in 2007.** *Arch Virol*, 155(8): 1307-1311.
- Benbow, S.J., Chan, A.W., Bowsher, D.R., Williams, G., Macfarlane, I.A. (1994). **The prediction of diabetic neuropathic plantar foot ulceration by liquid-crystal contact thermography.** *Diabetes Care*, 17(8): 835-839.
- Bender, T.R., Jones, T.S., DeWitt, W.E., Kaplan, G.J., Saslow, A.R., Nevius, S.E., Clark, P.S., Gangarosa, E.J. (1972). **Salmonellosis associated with whale meat in an eskimo community.** *Am J Epidemiol*, 96(2): 153-160.
- Bernal-Guadarrama, M.J., Salichs, J., Almunia, J., García-Parraga, D., Fernández-Gallardo, N., Santana-Morales, M.Á., Pacheco, V., Afonso-Lehmann, R.N., Déniz, D., Lorenzo-Morales, J., Valladares, B., Martínez-Carretero, E. (2014a). **Development of an indirect immunofluorescence technique for the diagnosis of toxoplasmosis in bottlenose dolphins.** *Parasitol Res*, 113(2): 451-455.
- Bernal-Guadarrama, M.J., García-Parraga, D., Fernández-Gallardo, N., Zamora-Padrón, R., Pacheco, V., Reyes-Batlle, M., Valladares, B., Lorenzo-Morales, J., Martínez-Carretero, E. (2014b). **Development of an indirect immunofluorescence technique for the evaluation of generated antibody titers against *Erysipelothrix rhusiopathiae* in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*).** *Arch Microbiol*, 196(11): 785-790.
- Bernadelli, A., Nader, A.J., Loureiro, J., Michelis, H., Debenedetti, R. (1990). **Micobacteriosis en mamíferos y aves marinas.** *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 9(4): 1121-1129.
- Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., de Villiers, E.M. (2010). **Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments.** *Virology*, 401(1): 70-79.
- Bernardelli, A., Nader, A.J., Loureiro, J., Michelis, H., Debenedetti, R. (1990). **Micobacteriosis en mamíferos y aves marinas.** *Rev Sci Tech*, 9(4): 1121-1129.
- Bernardelli, A., Bastida, R., Loureiro, J., Michelis, H., Romano, M.I., Cataldi, A., Costa, E. (1996). **Tuberculosis in sea lions and fur seals from south-western Atlantic coast.** *Rev Sci Tech*, 15(3): 985-1005.
- Bharara, M., Cobb, J.E., Claremont, D.J. (2006). **Thermography and thermometry in the assessment of diabetic neuropathic foot: a case for furthering the role of thermal techniques.** *Int J Low Extrem Wounds*, 5(4): 250-260.
- Bharara, M., Schoess, J., Armstrong, D.G. (2012). **Coming events cast their shadows before: detecting inflammation in the acute diabetic foot and the foot in remission.** *Diabetes Metab Res Rev*, 28(Suppl.1): 15-20.

- Birkun, A.Jr., Kuiken, T., Krivokhizhin, S., Haines, D.M., Osterhaus, A.D., van de Bildt, M.W., Joiris, C.R., Siebert, U. (1999). **Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (*Delphinus delphis ponticus*) from the Black sea.** *Vet Rec*, 144(4): 85-92.
- Birnbaum, S.J., Kliot, D. (1964). **Thermography-obstetrical applications.** *Ann N Y Acad Sci*, 121: 209-222.
- Bitar, D., Goubar, A., Desenclos, J.C. (2009). **International travels and fever screening during epidemics: a literature review on the effectiveness and potential use of non-contact infrared thermometers.** *Euro Surveill*, 14(6): 10-14.
- Blacklaws, B.A., Gajda, A.M., Tippelt, S., Jepson, P.D., Deaville, R., Van Bressem, M.F., Pearce, G.P. (2013). **Molecular characterization of poxviruses associated with tattoo skin lesions in UK cetaceans.** *PLoS One*, 8(8): e71734.
- Blanchard, T.W., Santiago, N.T., Lipscomb, T.P., Garber, R.L., McFee, W.E., Knowles, S. (2001). **Two novel alphaherpesviruses associated with fatal disseminated infections in Atlantic bottlenose dolphins.** *J Wildl Dis*, 37(2): 297-305.
- Blixenkrone-Moller, M., Sharma, B., Varsanyi, T.M., Hu, A., Norrby, E., Kovamees, J. (1992). **Sequence analysis of the genes encoding the nucleocapsid protein and phosphoprotein (P) of phocid distemper virus, and editing of the P gene transcript.** *J Gen Virol*, 73(4): 885-893.
- Blixenkrone-Moller, M., Bolt, G., Gottschalck, E., Kenter, M. (1994). **Comparative analysis of the gene encoding the nucleocapsid protein of dolphin morbillivirus reveals its distant evolutionary relationship to measles virus and ruminant morbilliviruses.** *J Gen Virol*, 75(10): 2829-2834.
- Blixenkrone-Moller, M., Bolt, G., Jensen, T.D., Harder, T., Svansson, V. (1996). **Comparative analysis of the attachment protein gene of dolphin morbillivirus.** *Virus Res*, 40(1): 47-55.
- Bodewes, R., Rubio García, A., Wiersma, L.C., Getu, S., Beukers, M., Schapendonk, C.M., van Run, P.R., van de Bildt, M.W., Poen, M.J., Osinga, N., Sánchez Contreras, G.J., Kuiken, T., Smits, S.L., Osterhaus, A.D. (2013a). **Novel B19-like parvovirus in the brain of a harbor seal.** *PLoS One*, 8(11): e79259.
- Bodewes, R., Morick, D., de Mutsert, G., Osinga, N., Bestebroer, T., van der Vliet, S., Smits, S.L., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D. (2013b). **Recurring influenza B virus infections in seals.** *Emerg Infect Dis*, 19(3): 511-512.
- Bodewes, R., Morick, D., van de Bildt, M.W.G, Osinga, N., Rubio García, A., Sánchez Contreras, G.J., Smits, S.L., Reperant, L.A.P., Kuiken, T., Osterhaus, A.D.M.E. (2013c). **Prevalence of phocine distemper virus specific antibodies: bracing for the next seal epizootic in north-western Europe.** *Emerg Microbes Infect*, 2(1): e3.
- Bodewes, R., Hapsari, R., Rubio García, A., Sánchez Contreras, G.J., van de Bildt, M.W., de Graaf, M., Kuiken, T., Osterhaus, A.D. (2014a). **Molecular epidemiology of seal parvovirus, 1988-2014.** *PLoS One*, 9(11): e112129.

- Bodewes, R., van de Bildt, M.W., van Elk, C.E., Bunschoek, P.E., van de Vijver, D.A., Smits, S.L., Osterhaus, A.D., Kuiken, T. (2014b). **No serological evidence that harbour porpoises are additional hosts of influenza B viruses.** *PLoS One*, 9(2): e89058.
- Bodewes, R., Contreras, G.J., Rubio García, A., Hapsari, R., van de Bildt, M.W.G., Kuiken, T., Osterhaus, A.D.M.E. (2015a). **Identification of DNA sequences that imply a novel gammaherpesvirus in seals.** *J Gen Virol*, 96: 1109-1114.
- Bodewes, R., Rubio García, A., Brasseur, S.M., Sanchez Conteras, G.J., van de Bildt, M.W., Koopmans, M.P., Osterhaus, A.D., Kuiken, T. (2015b). **Seroprevalence of antibodies against seal influenza A (H10N7) virus in harbor seals and gray seals from the Netherlands.** *PLoS One*, 10(12): e0144899.
- Bodewes, R., Bestebroer, T.M., van der Vries, E., Verhagen, J.H., Herfst, S., Koopmans, M.P., Fouchier, R.A., Pfankuche, V.M., Wohlsein, P., Siebert, U., Baumgärtner, W., Osterhaus, A.D. (2015c). **Avian influenza A (H10N7) virus-associated mass deaths among harbor seals.** *Emerg Infect Dis*, 21(4): 720-722.
- Bodewes, R., Zohari, S., Krog, J.S., Hall, M.D., Harder, T.C., Bestebroer, T.M., van de Bildt, M.W., Spronken, M.I., Larsen, L.E., Siebert, U., Wohlsein, P., Puff, C., Seehusen, F., Baumgärtner, W., Härkönen, T., Smits, S.L., Herfst, S., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., Koopmans, M.P., Kuiken, T. (2016). **Spatiotemporal analysis of the genetic diversity of seal influenza A (H10N7) virus, Northwestern Europe.** *J Virol*, 90(9): 4269-4277.
- Bokken, G.C., Bergwerff, A.A., van Knapen, F. (2012). **A novel bead-based assay to detect specific antibody responses against *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* simultaneously in sera of experimentally infected swine.** *BMC Vet Res*, 8: 36.
- Bonar, C.J., Boede, E.O., Hartmann, M.G., Lowenstein-Whaley, J., Mujica-Jorquera, E., Parish, S.V., Parish, J.V., Garner, M.M., Stadler, C.K. (2007). **A retrospective study of pathologic findings in the Amazon and Orinoco river dolphin (*Inia geoffrensis*) in captivity.** *J Zoo Wildl Med*, 38(2): 177-191.
- Borst, G.H.A., Walvoort, H.C., Reijnders, P.J.H., van der Kamp, J.S., Osterhaus, A.D.M.E. (1986). **An outbreak of a herpesvirus in harbor seals (*Phoca vitulina*).** *J Wildl Dis*, 22(1): 1-6.
- Boseret, G., Jauniaux, T., Mainil, J. (2002). ***Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in stranded harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) and harbour seal (*Phoca vitulina*).** En *Proc 2002 Eur Assoc Zoo Wildl Vet Annu Meet.* (A.H.M. Erken, G.M. Dorrenstein, P. Dollinger, Eds.), pp. 15-17. Van Setten Kwadraat, Houten.
- Bossart, G.D., Eimstad, E.A. (1988). ***Erysipelothrix* vesicular glossitis in a killer whale (*Orcinus orca*).** *J Zoo Wildl Med*, 19(1-2): 42-47.
- Bossart, G.D., Schwartz, J.C. (1990). **Acute necrotizing enteritis associated with suspected coronavirus infection in three harbor seals (*Phoca vitulina*).** *J Zoo Wildl Med*, 21(1): 84-87.

- Bossart, G.D., Cray, C., Solorzano, J.L., Decker, S.J., Cornell, L.H., Altman, N.H. (1996). **Cutaneous papillomaviral-like papillomatosis in a killer whale (*Orcinus orca*)**. *Mar Mammal Sci*, 12(2): 274-281.
- Bossart, G.D., Ghim, S.J., Rehtanz, M., Goldstein, J., Varela, R., Ewing, R.Y., Fair, P.A., Lenzi, R.J.B., Hicks, C.L., Schneider, L.S., McKinnie, C.J., Reif, J.S., Sanchez, R., Lopez, A., Novoa, S., Bernal, J., Goretti, M., Rodriguez, M., Defran, R.H., Jenson, A.B. (2005). **Orogenital neoplasia in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)**. *Aquat Mamm*, 31(4): 473-480.
- Bossart, G.D. (2007). **Emerging diseases in marine mammals: from dolphins to manatees**. *Microbe*, 2(11): 544-549.
- Bossart, G.D., Reif, J.S., Schaefer, A.M., Goldstein, J., Fair, P.A., Saliki, J.T. (2010). **Morbillivirus infection in free-ranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Southeastern United States: seroepidemiologic and pathologic evidence of subclinical infection**. *Vet Microbiol*, 143 (2-4): 160-166.
- Bossart, G.D. (2011). **Marine mammals as sentinel species for oceans and human health**. *Vet Pathol*, 48(3): 676-690.
- Bowater, R.O., Norton, J., Johnson, S., Hill, B., O'Donoghue, P., Prior, H. (2003). **Toxoplasmosis in Indo-Pacific humpbacked dolphins (*Sousa chinensis*) from Queensland**. *Aust Vet J*, 81(10): 627-632.
- Bowenkamp, K.E., Frasca S.Jr., Draghi, A., Tsongalis, G.J., Koerting, C., Hinckley, L., De Guise, S., Montali, R.J., Goertz, C.E., St Aubin, D. J., Dunn, J.L. (2001). ***Mycobacterium marinum* dermatitis and panniculitis with chronic pleuritis in a captive white whale (*Delphinapterus leucas*) with aortic rupture**. *J Vet Diagn Invest*, 13(6): 524-530.
- Bracht, A.J., Brudek, R.L., Ewing, R.Y., Manire, C.A., Burek, K.A., Rosa, C., Beckmen, K.B., Maruniak, J.E., Romero, C.H. (2006). **Genetic identification of novel poxviruses of cetaceans and pinnipeds**. *Arch Virol*, 151(3): 423-438.
- Bricker, B.J., Ewalt, D.R., MacMillan, A.P., Foster, G., Brew, S. (2000). **Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals**. *J Clin Microbiol*, 38(3): 1258-1262.
- Britt, J.O.Jr., Nagy, A.Z., Howard, E.B. (1979). **Acute viral hepatitis in California sea lions**. *J Am Vet Med Assoc*, 175(9): 921-923.
- Brooke, C.J., Riley, T.V. (1999). ***Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen**. *J Med Microbiol*, 48(9): 789-799.
- Brooks, J.P., Perry, W.B., Putnam, A.T., Karulf, R.E. (2000). **Thermal imaging in the detection of bowel ischemia**. *Dis Colon Rectum*, 43(9): 1319-1321.

- Buck, J.D., Spotte, S. (1986a). Microbiology of captive whitebeaked dolphins, *Lagenorhynchus albirostris*, with comments on epizootics. *Zoo Biol*, 5(4): 321-329.
- Buck, J.D., Spotte, S. (1986b). The occurrence of potentially pathogenic vibrios in marine mammals. *Mar Mammal Sci*, 2: 319.
- Buck, J.D., Shepard, L.L., Spotte, S. (1987). *Clostridium perfringens* as the cause of death of a captive Atlantic bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Wildl Dis*, 23(3): 488-491.
- Buck, J.D., Shepard, L.L., Bubucis, P.M., Spotte, S., McClave, K., Cook, R.A. (1989) Microbiological characteristics of white whale (*Delphinapterus leucas*) from capture through extended captivity. *Can J Fish Aquat Sci*, 46(11): 1914-1921.
- Buck, J.D., Schroeder, J.P. (1990). Public health significance of marine mammal disease. En *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. (L.A. Dierauf, Ed.), pp. 163-173. CRC Press, Boca Raton.
- Buckles, E.L., Lowenstine, L.J., DeLong, R.L., Melin, S.R., Vittore, R.K., Wong, H.N., Ross, G.L., St Leger, J.A., Greig, D.J., Duerr, R.S., Gulland, F.M., Stott, J.L. (2007). Age-prevalence of Otarine Herpesvirus-1, a tumor-associated virus, and possibility of its sexual transmission in California sea lions. *Vet Microbiol*, 120(1-2): 1-8.
- Burek, K.A., Beckmen, K., Gelatt, T., Fraser, W., Bracht, A.J., Smolarek, K.A., Romero, C.H. (2005). Poxvirus infection of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) in Alaska. *J Wildl Dis*, 41(4): 745-752.
- Burmeister, D.M., Cerna, C., Becerra, S.C., Sloan, M., Wilmink, G., Christy, R.J. (2016). Noninvasive techniques for the determination of burn severity in real time. *J Burn Care Res*, Versión digital: 22 enero.
- Cabello, J., Esperón, F., Napolitano, C., Hidalgo, E., Dávila, J.A., Millán, J. (2013). Molecular identification of a novel gammaherpesvirus in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*). *J Gen Virol*, 94: 2745-2749.
- Callan, R.J., Early, G., Kida, H., Hinshaw, V.S. (1995). The appearance of H3 influenza viruses in seals. *J Gen Virol*, 76(1): 199-203.
- Calle, P.P., Kenny, D.E., Cook, R.A. (1993). Successful treatment of suspected erysipelas septicemia in a beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *Zoo Biology*, 12(5): 483-490.
- Calle, P.P., Stetter, M.D., Cook, R.A., McClave, C.A., Massucci, S. (1995). Enteric salmonellosis of captive Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*). En *Proc 26th Annu Workshop Int Assoc Aquat Anim Med*, 92-93.
- Campbell, G.S., Norman, J.M. (1998). Radiation basics. En *An Introduction to Environmental Biophysics. Second edition*. (G.S. Campbell, J.M. Norman, Eds.), pp. 147-165. Springer, New York.
- Carlo, A.D. (1995). Thermography and the possibilities for its applications in clinical and experimental dermatology. *Clin Dermatol*, 13(4): 329-336.



- Carwardine, M., Camm, M. (2002). *Whales, dolphins and porpoises. Smithsonian handbooks*. Pp. 256. Dorling Kindersley Publishing, New York.
- Caswell, J.L., Williams, K.J. (2007). **Respiratory system**. En *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Fifth edition*. (M.G. Maxie, Ed.), pp. 523-653. Elsevier, Philadelphia.
- Centelleghé, C., Beffagna, G., Zanetti, R., Zappulli, V., Di Guardo, G., Mazzariol, S. (2016). **Molecular analysis of dolphin morbillivirus: A new sensitive detection method based on nested RT-PCR**. *J Virol Methods*, 235: 85-91.
- Chan, L.S., Cheung, G.T., Lauder, I.J., Kumana, C.R., Lauder, I.J. (2004). **Screening for fever by remote-sensing infrared thermographic camera**. *J Travel Med*, 11(5): 273-279.
- Chang, K., Yoon, S., Sheth, N., Seidel, M., Antalek, M., Ahad, J., Darlington, T., Ikeda, A., Kato, G.J., Ackerman, H., Gorbach, A.M. (2015). **Rapid vs. delayed infrared responses after ischemia reveal recruitment of different vascular beds**. *Quant Infrared Thermogr J*, 12(2): 173-183.
- Chastel, C., Masure, O., Balouet, G., Laban, P., Lucas, A. (1975). **The student, the cetacean and swine-fever: a minor epidemic after dissection of a globicephale**. *Nouv Presse Med*, 4(24): 1803-1805.
- Cherkas, L.F., Carter, L., Spector, T.D., Howell, K.J., Black, C.M., MacGregor, A.J. (2003). **Use of thermographic criteria to identify Raynaud's phenomenon in a population setting**. *J Rheumatol*, 30(4): 720-722.
- Cheville, N.F. (1994). *Ultrastructural pathology. An introduction to interpretation*. Pp. 946. Iowa State University Press, Ames.
- Christopher-Hennings, J., Araujo, K.P., Souza, C.J., Fang, Y., Lawson, S., Nelson, E.A., Clement, T., Dunn, M., Lunney, J.K. (2013). **Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories**. *J Vet Diagn Invest*, 25(6): 671-691.
- Clark, C., McIntyre, P.G., Evans, A., McInnes, C.J., Lewis-Jones, S. (2005). **Human sealpox resulting from a seal bite: confirmation that sealpox virus is zoonotic**. *Br J Dermatol*, 152(4): 791-793.
- Clavareau, C., Wellemans, V., Walravens, K., Tryland, M., Verger, J.M., Grayon, M., Cloeckaert, A., Letesson, J.J., Godfroid, J. (1998). **Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*)**. *Microbiology*, 144(12): 3267-3273.
- Clavijo, A., Hole, K., Li, M., Collignon, B. (2006). **Simultaneous detection of antibodies to foot-and-mouth disease nonstructural proteins 3ABC, 3D, 3A and 3B by a multiplexed Luminex assay to differentiate infected from vaccinated cattle**. *Vaccine*, 24(10): 1693-1704.

- Clayton, L.A., Stamper, M.A., Whitaker, B.R., Hadfield, C.A., Simons, B., Mankowski, J.L. (2012). *Mycobacterium abscessus* pneumonia in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med*, 43(4): 961-965.
- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Paquet, J.Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G., Godfroid, J. (2001). Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect*, 3(9): 729-738.
- Cloeckaert, A., Grayon, M., Grépinet, O., Boumedine, K.S. (2003). Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect*, 5(7): 593-602.
- Colgrove, G.S., Migaki, G. (1976). Cerebral abscess associated with stranding in a dolphin. *J Wildl Dis*, 12(2): 271-274.
- Colegrove, K.M., St Leger, J.A., Raverty, S., Jang, S., Berman-Kowalewski, M., Gaydos, J.K. (2010). *Salmonella* Newport omphaloarteritis in a stranded killer whale (*Orcinus orca*) neonate. *J Wildl Dis*, 46(4): 1300-1304.
- Cortés-Hinojosa, G., Gulland, F.M., Goldstein, T., Venn-Watson, S., Rivera, R., Waltzek, T.B., Salemi, M., Wellehan, J.F.Jr. (2015). Phylogenomic characterization of California sea lion adenovirus-1. *Infect Genet Evol*, 31: 270-276.
- Cosh, J.A., Ring, E.F.J. (1970). Thermography and rheumatology. *Rheumatol*, 10(7): 342-348.
- Cousins, D.V. (1987). ELISA for the detection of tuberculosis in seals. *Vet Rec*, 121(13): 305.
- Cousins, D.V., Williams, S.N., Reuter, R., Forshaw, D., Chadwick, B., Coughran, D., Collins, P., Gales, N. (1993). Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus. *Aust Vet J*, 70(3): 92-97.
- Cousins, D.V. (2006). Tuberculosis in fur seals and sea lions caused by *Mycobacterium pinnipedii*. En *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Second edition. (C.O. Thoen, J.H. Steele, M.J. Gilsdorf, Eds.), pp. 258-270. Blackwell Publishing, Ames.
- Crombé, F., Vanderhaeghen, W., de Vogel, C.P., Van Wamel, W.J., Barbé, K., Hermans, K., Haesebrouck, F., Butaye, P. (2013). Serological profiles in nursery piglets colonized with *Staphylococcus aureus*. *Vet Res*, 44: 4.
- Crozier, I., Daly, M., Lim, G., Roper, G. (2015). Esophageal infrared thermography during atrial fibrillation ablation. *Heart Rhythm*, 12(11): 2362-2363.
- Cusick, P.K., Bullock, B.C. (1973). Ulcerative dermatitis and pneumonia associated with *Aeromonas hydrophila* infection in the bottle-nosed dolphin. *J Am Vet Med Assoc*, 163(6): 578-579.
- Cuyler, L.C., Wiulsrød, R., ØRitsland, N.A. (1992). Thermal infrared radiation from free living whales. *Mar Mamm Sci*, 8(2): 120-134.

- Dagleish, M.P., Barley, J., Howie, F.E., Reid, R.J., Herman, J., Foster, G. (2007). Isolation of *Brucella* species from a diseased atlanto-occipital joint of an Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*). *Vet Rec*, 160(25): 876-878.
- Dagleish, M.P., Barley, J., Finlayson, J., Reid, R.J., Foster, G. (2008). *Brucella ceti* associated pathology in the testicle of a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Comp Pathol*, 139(1): 54-59.
- Dagleish, M.P., Barrows, M., Maley, M., Killick, R., Finlayson, J., Goodchild, R., Valentine, A., Saunders, R., Willoughby, K., Smith, K.C., Stidworthy, M.F. (2013). The first report of otarine herpesvirus-1-associated urogenital carcinoma in a South American fur seal (*Arctocephalus australis*). *J Comp Pathol*, 149(1): 119-125.
- Dagna, L., Pritchett, J.C., Lusso, P. (2014). Immunomodulation and immunosuppression by human herpesvirus 6A and 6B. *Future Virol*, 8(3): 273-287.
- Dailey, M.D. (1985). Diseases of Mammalia: Cetacea. En *Diseases of Marine Animals*. (O. Kinne, Ed.), pp. 805-847. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg.
- Dalebout, M.L., Baker, C.S., Steel, D., Thompson, K., Robertson, K.M., Chivers, S.J., Perrin, W.F., Goonatilake, M., Anderson, R.C., Mead, J.G., Potter, C.W., Thompson, L., Jupiter, D., Yamada, T.K. (2014). Resurrection of *Mesoplodon hotaula* Deraniyagala 1963: A new species of beaked whale in the tropical Indo-Pacific. *Mar Mamm Sci*, 30(3): 1081-1108.
- Dalton, L.M., Robeck, T.R. (1995). Multifocal pyogranulomatous pneumonia in a killer whale calf. En *Proc 26th Annu Workshop Int Assoc Aquat Anim Med*, 26: 84-85.
- Danner, G.R., McGregor, M.W., Zarnke, R.L., Olsen C.W. (1998). Serologic evidence of influenza virus infection in a ringed seal (*Phoca hispida*). *Mar Mammal Sci*, 14(2): 380-384.
- Daoust, P.Y., Taylor, R.G., Greenlaw, B.L. (1994). Herpesvirus in botriomycotic lesions from a harp seal (*Phoca groenlandica*). *Vet Pathol*, 31(3): 385-389.
- Daura-Jorge, F.G., Simões-Lopes, P.C. (2011). Lobomycosis-like disease in wild bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* of Laguna, southern Brazil: monitoring of a progressive case. *Dis Aquat Org*, 93(2): 163-170.
- Davison, A.J. (2010). Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*, 143(1): 52-69.
- Davison, N.J., Barnett, J.E., Perrett, L.L., Dawson, C.E., Perkins, M.W., Deaville, R.C., Jepson, P.D. (2013). Meningoencephalitis and arthritis associated with *Brucella ceti* in a short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*). *J Wildl Dis*, 49(3): 632-636.
- Davison, N.J., Brownlow, A., McGovern, B., Dagleish, M.P., Perrett, L.L., Dale, E.J., Koylass, M., Foster, G. (2015). First report of *Brucella ceti*-associated meningoencephalitis in a long-finned pilot whale *Globicephala melas*. *Dis Aquat Organ*, 116(3): 237-241.

- Dawson, C.E., Perrett, L.L., Stubberfield, E.J., Stack, J.A., Farrelly, S.S., Cooley, W.A., Davison, N.J., Quinney, S. (2008). Isolation and characterization of *Brucella* from the lungworms of a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Wildl Dis*, 44(2): 237-246.
- De Boer, G.F., Back, W., Osterhaus, A.D. (1990). An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Arch Virol*, 115(1-2): 47-61.
- De Guise, S., Lagace, A., Béland, P. (1994). Gastric papillomas in eight St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *J Vet Diagn Invest*, 6(3): 385-388.
- De Guise, S., Lagace, A., Beland, P., Girard, C., Higgins, R. (1995). Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from the St Lawrence Estuary. *J Comp Pathol*, 112(3): 257-271.
- Dejours, P. (1987). Water and air physical characteristics and their physiological consequences. En Comparative physiology: life in water and on land. (P. Dejours, L. Bolis, C.R. Taylor, E.R. Weibel, Eds.), pp. 3-11. Liviana Press, Padova.
- De Moura, J.F., Hauser-Davis, R.A., Lemos, L., Emin-Lima, R., Siciliano, S. (2014). Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) as marine ecosystem sentinels: ecotoxicology and emerging diseases. *Rev Environ Contam Toxicol*, 228: 1-29.
- Deregt, D., Gilbert, S.A., Dudas, S., Pasick, J., Baxi, S., Burton, K.M., Baxi, M.K. (2006). A multiplex DNA suspension microarray for simultaneous detection and differentiation of classical swine fever virus and other pestiviruses. *J Virol Methods*, 136(1-2): 17-23.
- Diamond, S.S., Ewing, D.E., Cadwell, G.A. (1979). Fatal bronchopneumonia and dermatitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in an Atlantic bottle-nosed dolphin. *J Am Vet Med Assoc*, 175(9): 984-987.
- Díaz-Delgado, J., Sierra, E., Vela, A. I., Domínguez, L., Andrada, M., Arbelo, M., Fernández, A. (2014). Endocarditis associated with *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* in a short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*). *J Wildl Dis*, 51(1): 283-286.
- Díaz-Delgado, J., Arbelo, M., Sierra, E., Vela, A., Domínguez, M., Paz, Y., Andrada, M., Domínguez, L., Fernández, A. (2015). Fatal *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia in two Atlantic dolphins (*Stenella frontalis* and *Tursiops truncatus*). *Dis Aquat Organ*, 116(1): 75-81.
- Di Bella, C., Macrì, B., Prato, F., Mazzullo, G., Loria, G.R. (1995). *Erysipelothrix rhusiopathiae* (insidiosa) in un delfino comune (*Delphinus delphis*) spiaggato in Sicilia. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 49: 589-590.
- Dierauf, L.A., Lowenstine, L.J., Jerome, C. (1981). Viral hepatitis (adenovirus) in a California sea lion. *J Am Vet Med Assoc*, 179(11): 1194-1197.
- Dierauf, L.A., Vandenbroek, D.J., Roletto, J., Koski, M., Amaya, L., Gage, L.J. (1985). An epizootic of leptospirosis in California sea lions. *J Am Vet Med Assoc*, 187(11): 1145-1148.

- Di Guardo, G., Agrimi, U., Amaddeo, D., McAliskey, M., Kennedy, S. (1992). **Morbillivirus infection in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the coast of Italy.** *Vet Rec*, 130(26): 579-580.
- Di Guardo, G., Agrimi, U., Morelli, L., Cardeti, G., Terracciano, G., Kennedy, S. (1995). **Post mortem investigations on cetaceans found stranded on the coasts of Italy between 1990 and 1993.** *Vet Rec*, 136(17): 439-442.
- Di Guardo, G., Marruchella, G., Agrimi, U., Kennedy, S. (2005). **Morbillivirus infections in aquatic mammals: a brief overview.** *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 52(2): 88-93.
- Di Guardo, G., Di Francesco, C.E., Eleni, C., Cocumelli, C., Scholl, F., Casalone, C., Peletto, S., Mignone, W., Tittarelli, C., Di Nocera, F., Leonardi, L., Fernandez, A., Marcer, F., Mazzariol, S. (2013). **Morbillivirus infection in cetaceans stranded along the Italian coastline: pathological, immunohistochemical and biomolecular findings.** *Res Vet Sci*, 94(1): 132-137.
- Di Guardo, G., Mazzariol, S. (2016). **Cetacean morbillivirus-associated pathology: knowns and unknowns.** *Front Microbiol*, 7: 112.
- Di Nocera, F., De Carlo, E., Maio, N., Pollaro, F., Iovane, G. (2009). **Record of a case of erysipelas in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the Salerno District seacoasts.** 8° *Convegno Nazionale sui Cetacei e sulle Tartarughe*. Pescara, Italia.
- Domiciano, I.G., Domit, C., Broadhurst, M.K., Koch, M.S., Bracarense, A.P. (2016). **Assessing disease and mortality among small cetaceans stranded at a world heritage site in Southern Brazil.** *PLoS One*, 11(2): e0149295.
- Domingo, M., Ferrer, L., Pumarola, M., Marco, A., Plana, J., Kennedy, S., McAliskey, M., Rima, B.K. (1990). **Morbillivirus in dolphins.** *Nature*, 348(6296): 21.
- Domingo, M., Visa, J., Pumarola, M., Marco, A.J., Ferrer, L., Rabanal, R., Kennedy, S. (1992). **Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*).** *Vet Pathol*, 29(1): 1-10.
- Domingo, M., Vilafranca, M., Visa, J., Prats, N., Trudgett, A., Visser, I. (1995). **Evidence for chronic morbillivirus infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*).** *Vet Microbiol*, 44(2): 229-239.
- Dover, S.R. (1992). **Poxvirus Infection in a killer whale: Clinical signs and diagnosis.** En *Proc 1992 Int Assoc Aquat Anim Med 23<sup>rd</sup> Annu Conf.* (J.W. Alexander, Ed.). Hong Kong, China.
- Duignan, P.J., Geraci, J.R., Raga, J.A., Calzada, N. (1992). **Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain.** *Can J Vet Res*, 56(3): 242-248.
- Duignan, P.J., House, C., Geraci, J.R., Duffy, N., Rima, B.K., Walsh, M.T., Early, G., St Aubin, D.J., Sadove, S., Koopman, H., Rhinehart, H. (1995a). **Morbillivirus infection in cetaceans of the western Atlantic.** *Vet Microbiol*, 44(2-4): 241-249.



- Duignan, P.J., House, C., Geraci, J.R., Early, G., Copland, H.G., Walsh, M.T., Bossart, G.D., Gray, C., Sadove, S., St Aubin, D.J., Moore, M. (1995b). **Morbillivirus infection in two species of pilot whale (*Globicephala* sp.) from the western Atlantic.** *Mar Mamm Sci*, 11(2): 150-162.
- Duignan, P.J. (1999). **Morbillivirus infections of marine mammals.** En *Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy 4*. (M.E. Fowler, R.E. Miller, Eds.), pp. 497-501. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Duignan, P.J. (2000). **Diseases of New Zealand sea mammals.** *Surveill*, 27(3): 9-15.
- Duignan, P.J., Van Bresse, M.F., Baker, J.D., Barbieri, M., Colegrove, K.M., De Guise, S., de Swart, R.L., Di Guardo, G., Dobson, A., Duprex, W.P., Early, G., Fauquier, D., Goldstein, T., Goodman, S.J., Grenfell, B., Groch, K.R., Gulland, F., Hall, A., Jensen, B.A., Lamy, K., Matassa, K., Mazzariol, S., Morris, S.E., Nielsen, O., Rotstein, D., Rowles, T.K., Saliki, J.T., Siebert, U., Waltzek, T., Wellehan, J.F. (2014). **Phocine distemper virus: current knowledge and future directions.** *Viruses*, 6(12): 5093-5134.
- Dunbar, S.A. (2006). **Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection.** *Clin Chim Acta*, 363(1-2): 71-82.
- Dunbar, M., Johnson, S.R., Rhyhan, J.C., McCollum, M. (2009). **Use of infrared thermography to detect thermographic change in mule deer (*Odocoileus hemionus*) experimentally infected with foot-and-mouth disease.** *J Zoo Wildl Med*, 40(2): 296-301.
- Dunn, J.L., Bowenkamp, K., Frasca, S., Montali, R.J., Goertz, C.E.C., Draghi, A.J., Tsongalis, G.J., St. Aubin, D.J. (2000). **Fusariomycosis, atypical mycobacterial pyogranulomatous panniculitis, and fatal aortic rupture in a white whale, (*Delphinapterus leucas*).** En *Proc 31st Annu Int Assoc Aquat Anim Med Conf*, 295-296.
- Dunn, J.L., Buck, J.D., Robeck, T.R. (2001). **Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds.** En *Handbook of marine mammal medicine: health, disease and rehabilitation. Second edition*. (L.A. Dierauf, F.M.D. Gulland, Eds.), pp. 312-319. CRC Press, Boca Raton.
- Ebstein, E. (1928). **Die entwicklung der klinischen thermometrie** (En alemán, “El desarrollo de la termometría clínica”). En el tomo 33 de la colección *Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde* (En alemán, “Resultados de medicina interna y pediátrica”) (A. Czerny, F. Kraus, L. Langstein, O. Minkowski, Fr. Müller, H. Sahli, A. Schittenhelm, Eds.), pp. 407-503. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ehlers, K. (1965). **Records of the hooded seal (*Cystophora cristata*) and other animals at Bremerhaven Zoo.** *International Zoo Yearbook*, 5: 149-152.
- Ehlers, B., Dural, G., Yasmum, N., Lembo, T., de Thoisy, B., Ryser-Degiorgis, M.P., Ulrich, R.G., McGeoch, D.J. (2008). **Novel mammalian herpesviruses and lineages within the *Gammaherpesvirinae*: cospeciation and interspecies transfer.** *J Virol*, 82(7): 3509-3516.

- Elshal, M.F., McCoy, J.P. (2006). **Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA.** *Methods*, 38(4): 317-323.
- Esperón, F., Fernández, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2008). **Herpes simplex-like infection in a bottlenose dolphin stranded in the Canary Islands.** *Dis Aquat Organ*, 81(1): 73-76.
- Esperón, F., García-Párraga, D., Bellière, E.N., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2012). **Molecular diagnosis of lobomycosis-like disease in a bottlenose dolphin in captivity.** *Med Mycol*, 50(1): 106-109.
- Evans, J.J., Pasnik, D.J., Klesius, P.H., Al- Ablani, S. (2006). **First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*).** *J Wild Dis*, 42(3): 561-569.
- Ewalt, D.R., Payeur, J.B., Martin, B.M., Cummins, D.R., Miller, W.G. (1994). **Characterization of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*).** *J Vet Diagn Invest*, 6(4): 448-452.
- Fernández, A., Esperón, F., Herráez, P., De Los Monteros, A.E., Clavel, C., Bernabe, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Verborgh, P., Destephanis, R., Toledano, F., Bayon, A. (2008). **Morbillivirus and pilot whale deaths, Mediterranean Sea.** *Emerg Infect Dis*, 14(5): 792-794.
- Fernández, A., Vela, A.I., Andrada, M., Herraez, P., Díaz-Delgado, J., Domínguez, L., Arbelo, M. (2011). ***Citrobacter freundii* septicemia in a stranded newborn Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*).** *J Wildl Dis*, 47(4): 1043-1046.
- Fiorito, C., Palacios, C., Golemba, M., Bratanich, A., Argüelles, M.B., Fazio, A., Bertellotti, M., Lombardo, D. (2015). **Identification, molecular and phylogenetic analysis of poxvirus in skin lesions of southern right whale.** *Dis Aquat Organ*, 116(2): 157-163.
- Fiorito, C.D., Bentancor, A., Lombardo, D., Bertellotti, M. (2016). ***Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from gullinflicted wounds in southern right whale calves.** *Dis Aquat Organ*, 121(1): 67-73.
- Flamand, L., Gosselin, J., Stefanescu, I., Ablashi, D., Menezes, J. (1995). **Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation.** *Blood*, 85(5): 1263-1271.
- Flom, J.O., Houk, E.J. (1979). **Morphologic evidence of poxvirus in "tattoo" lesions from captive bottlenosed dolphins.** *J Wildl Dis*, 15(4): 593-596.
- Flowers, D.J. (1970). **Human infection due to *Mycobacterium marinum* after a dolphin bite.** *J Clin Pathol*, 23(6): 475-477.
- Foord, A.J., White, J.R., Colling, A., Heine, H. (2013). **Microsphere suspension array assays for detection and differentiation of Hendra and Nipah viruses.** *BioMed Res Int*, 2013: 289295.
- Forbes, L.B., Nielsen, O., Measures, L., Ewalt, D.R. (2000). **Brucellosis in ringed seals and harp seals from Canada.** *J Wildl Dis*, 36(3): 595-598.

- Forshaw, D., Phelps, G.R. (1991). Tuberculosis in a captive colony of pinnipeds. *J Wildl Dis*, 27(2): 288-295.
- Foster, G., Jahans, K.L., Reid, R.J., Ross, H.M. (1996). Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Vet Rec*, 138(24): 583-586.
- Foster, G., Ross, H.M., Patterson, I.A.P., Reid, R.J., Munro, D.S. (1998). *Salmonella typhimurium* DT104 in a grey seal. *Vet Rec*, 142(22): 615.
- Foster, G., Patterson, I.A., Munro, D.S. (1999). Monophasic group B *Salmonella* species infecting harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) inhabiting Scottish coastal waters. *Vet Microbiol*, 65(3): 227-231.
- Foster, G., McAuliffe, L., Dagleish, M.P., Barley, J., Howie, F., Nicholas, R.A., Ayling, R.D. (2011). *Mycoplasma* species isolated from harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) and a Sowerby's beaked whale (*Mesoplodon bidens*) stranded in Scottish waters. *J Wildl Dis*, 47(1): 206-211.
- Foster, J.D., Hartmann, F.A., Moriello, K.A. (2012). A case of apparent canine erysipeloid associated with *Erysipelothrix rhusiopathiae* bacteraemia. *Vet Dermatol*, 23(6): 528-530.
- Foster, G., Whatmore, A.M., Dagleish, M.P., Baily, J.L., Deaville, R., Davison, N.J., Koylass, M.S., Perrett, L.L., Stubberfield, E.J., Reid, R.J., Brownlow, A.C. (2015). Isolation of *Brucella ceti* from a Long-finned Pilot Whale (*Globicephala melas*) and a Sowerby's Beaked Whale (*Mesoploden bidens*). *J Wildl Dis*, 51(4): 868-871.
- Fujioka, R.S., Greco, S.B., Cates, M.B., Schroeder, J.P. (1988). *Vibrio damsela* from wounds in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Dis Aquat Org*, 4: 1-8.
- Fury, C.A., Reif, J.S. (2012). Incidence of poxvirus-like lesions in two estuarine dolphin populations in Australia: links to flood events. *Sci Total Environ*, 416: 536-540.
- Fushimi, H., Inoue, T., Nishikawa, M., Matsuyama, Y., Kitagawa, J. (1985). A new index of autonomic neuropathy in diabetes mellitus: heat stimulated thermographic patterns. *Diabetes Res Clin Pract*, 1(2): 103-107.
- Gage, L.J., Amaya-Sherman, L., Roletto, J., Bently, S. (1990). Clinical signs of San Miguel sea lion virus in debilitated California sea lions. *J Zoo Wildl Med*. 21(1): 79-83.
- Garagiola, U., Giani, E. (1990). The use of telethermography in the management of sport injuries. *Spo Med*, 10(4): 267-272.
- García-Álvarez, N., Boada, L.D., Fernández, A., Zumbado, M., Arbelo, M., Sierra, E., Xuriach, A., Almunia, J., Camacho, M., Luzardo, O.P. (2014). Assessment of the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine contaminants in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Eastern Atlantic Ocean. *Mar Environ Res*, 100: 48-56.
- Garner, M.M., Lambourn, D.M., Jeffries, S.J., Hall, P.B., Rhyan, J.C., Ewalt, D.R., Polzin, L.M., Cheville, N.F. (1997). Evidence of *Brucella* infection in *Parafilaroides*

- lungworms in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *J Vet Diagn Invest*, 9(3): 298-303.
- Garofolo, G., Zilli, K., Troiano, P., Petrella, A., Marotta, F., Di Serafino, G., Ancora, M., Di Giannatale, E. (2014). *Brucella ceti* from two striped dolphins stranded on Apulia coastline, Italy. *J Med Microbiol*, 63(2): 325-329.
- Gautherie, M., Gros, C.M. (1980). Breast thermography and cancer risk prediction. *Cancer*, 45(1): 51-56.
- Gastaldelli, M., Stefani, E., Lettini, A.A., Pozzato, N. (2011). Multiplexed typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* types I, II, and III by Luminex xMAP suspension array. *J Clin Microbiol*, 49(1): 389-391.
- Geraci, J.R., Sauer, R.M., Medway, W. (1966). Erysipelas in dolphins. *Am J Vet Res*, 27(117): 597-606.
- Geraci, J.R., Hicks, B.D., St Aubin, D.J. (1979). Dolphin pox: a skin disease of cetaceans. *Can J Comp Med*, 43(4): 399-404.
- Geraci, J.R., St Aubin, D.J., Barker, I.K., Webster, R.G., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Ruhnke, H.L., Prescott, J.H., Early, G., Baker, A.S., Madoff, S., Schooley, R.T. (1982). Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science*, 215(4536): 1129-1131.
- Geraci, J.R., Palmer, N.C., St. Aubin, D.J. (1987). Tumors in cetaceans: Analysis and new findings. *Can J Fish Aquat Sci*, 44: 1289-1300.
- Geraci, J.R., Lounsbury, V.J. (1993). *Marine mammals ashore. A field guide for strandings*, pp. 309. Texas A&M Sea Grant Publication, Galveston.
- Gershon-Cohen, J., Haberman-Brueschke, J.D., Brueschke, E.E. (1965). Obstetric and gynecologic thermography. *Obstet Gynecol*, 26(6): 842-847.
- Giebel, J., Meier, J., Binder, A., Flossdorf, J., Poveda, J.B., Schmidt, R., Kirchhoff, H. (1991). *Mycoplasma phocarhini* sp. nov., and *Mycoplasma phocacerebrale* sp. nov., two new species from harbor seals (*Phoca vitulina* L.). *Int J Syst Bacteriol*, 41(1): 39-44.
- Gilmartin, W.G., Delong, R.L., Smith, A.W., Sweeney, J.C., De Lappe, B.W., Risebrough, R.W., Griner, L.A., Dailey, M.D., Peakall, D.B. (1976). Premature parturition in the California sea lion. *J Wildl Dis*, 12(1): 104-115.
- Gilmartin, W.G., Varnik, P.M., Neill, V.M. (1979). Salmonellae in feral pinnipeds off the Southern California coast. *J Wildl Dis*, 15(4): 511-513.
- Giménez-Lirola, L.G., Xiao, C.T., Halbur, P.G., Opriessnig, T. (2012). Development of a novel fluorescent microbeadbased immunoassay and comparison with three enzymelinked immunoassays for detection of anti-*Erysipelothrix* spp. IgG antibodies in pigs with known and unknown exposure. *J Microbiol Methods*, 91(1): 73-79.
- Giménez-Lirola, L.G., Mur, L., Rivera, B., Mogler, M., Sun, Y., Lizano, S., Goodell, C., Harris, D.L.H., Rowland, R.R.R., Gallardo, C., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Zimmerman, J.

- (2016). Detection of african swine fever virus antibodies in serum and oral fluid specimens using a recombinant protein 30 (p30) dual matrix indirect ELISA. *PLoS ONE*, 11(9): e0161230.
- Glaser, R., Kiecolt-Glaser, J.K. (1994). Stress-associated immune modulation and its implications for reactivation of latent herpesviruses. En *Herpesvirus infections*. (R. Glaser, J. Jones, Eds.), pp. 245-270. Marcel Dekker, New York.
- Go, Y.Y., Wong, S.J., Branscum, A.J., Demarest, V.L., Shuck, K.M., Vickers, M.L., Zhang, J., McCollum, W.H., Timoney, P.J., Balasuriya, U.B. (2008). Development of a fluorescent-microsphere immunoassay for detection of antibodies specific to equine arteritis virus and comparison with the virus neutralization test. *Clin Vaccine Immunol*, 15(1): 76-87.
- Goertz, C.E., Frasca, S., Bohach, G.A., Cowan, D.F., Buck, J.D., French, R.A., De Guise, S., Maratea, J., Hinckley, L., Ewalt, D., Schlievert, P.M., Karst, S.M., Deobald, C.F., St Aubin, D.J., Dunn, J.L. (2011). *Brucella* sp. vertebral osteomyelitis with intercurrent fatal *Staphylococcus aureus* toxigenic enteritis in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest*, 23(4): 845-851.
- Goldstein, T., Gulland, F.M.D., Braun, R.C., Antonelis, G.A., Kashinsky, L., Rowles, T.K., Mazet, J.A.K., Dalton, L.M., Aldridge, B.M., Stott, J.L. (2006a). Molecular identification of a novel gammaherpesvirus in the endangered Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*). *Mar Mamm Sci*, 22(2): 465-471.
- Goldstein, T., Lowenstine, L.J., Lipscomb, T.P., Mazet, J.A., Novak, J., Stott, J.L., Gulland, F.M. (2006b). Infection with a novel gammaherpesvirus in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *J Wildl Dis*, 42(4): 830-835.
- Goldstein, T., Colegrove, K.M., Hanson, M., Gulland, F.M. (2011). Isolation of a novel adenovirus from California sea lions *Zalophus californianus*. *Dis Aquat Organ*, 94(3): 243-248.
- Goldstein, T., Mena, I., Anthony, S.J., Medina, R., Robinson, P.W., Greig, D.J., Costa, D.P., Lipkin, W.I., Garcia-Sastre, A., Boyce, W.M. (2013). Pandemic H1N1 influenza isolated from free-ranging northern elephant seals in 2010 off the central California coast. *PLoS One*, 8(5): e62259.
- González, L., Patterson, I.A., Reid, R.J., Foster, G., Barberan, M., Blasco, J.M., Kennedy, S., Howie, F.E., Godfroid, J., Macmillan, A.P., Schock, A., Buxton, D. (2002). Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella* sp. infection in live-stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *J Comp Pathol*, 126(2-3): 147-152.
- González-Barrientos, R., Morales, J.A., Hernandez-Mora, G., Barquero-Calvo, E., Guzman-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Moreno, E. (2010). Pathology of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) infected with *Brucella ceti*. *J Comp Pathol*, 142(4): 347-352.
- Gottschling, M., Bravo, I.G., Schulz, E., Bracho, M.A., Deaville, R., Jepson, P.D., Van Bresse, M.F., Stockfleth, E., Nindl, I. (2011). Modular organizations of novel cetacean papillomaviruses. *Mol Phylogenet Evol*, 59(1): 34-42.



- Gratt, B., Anbar, M. (1998). Thermology and facial telethermography: Part II. Current and future clinical applications in dentistry. *Dentomaxillofac Radiol*, 27(2): 68-74.
- Greco, S.B., Fujioka, R.S., Cates, M.B., Schroeder, J.P. (1985). Assessing the concentrations and significance of *Vibrio* bacteria in pens used to house marine mammals. En *Proc 16th Annu Workshop Int Assoc Aquat Anim Med*, 139.
- Greer, R.J., Cohn, L.A., Dodam, J.R., Wagner-Mann, C.C., Mann, F.A. (2007). Comparison of three methods of temperature measurement in hypothermic, euthermic, and hyperthermic dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 230(12): 1841-1848.
- Groch, K.R., Colosio, A.C., Marcondes, M.C., Zucca, D., Díaz-Delgado, J., Niemeyer, C., Marigo, J., Brandao, P.E., Fernández, A., Luiz Catao-Dias, J. (2014). Novel cetacean morbillivirus in Guiana dolphin, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 20(3): 511-513.
- Gröne, A., Weckmann, M.T., Capen, C.C., Rosol, T.J. (1996). Canine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complementary DNA: polymerase chain reaction amplification, cloning, partial sequence analysis, and use as loading control in ribonuclease protection assays. *Am J Vet Res*, 57(3): 254-257.
- Gulland, F.M.D., Koski, M., Lowenstine, L.J., Colagross, A., Morgan, L., Spraker, T. (1996). Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, 1981-1994. *J Wildl Dis*, 32(4): 572-580.
- Gulland, F.M.D., Lowenstine, L.J., Lapointe, J.M., Sparker, T., King, D.P. (1997). Herpesvirus infection in stranded harbor seals of coastal California. *J Wildl Dis*, 33(3): 450-458.
- Gutter, A.E., Wells, S.K., Spraker, T.R. (1987). Generalized mycobacteriosis in a California sea lion (*Zalophus californicus*). *J Zoo Animal Med*, 18(2-3): 118-120.
- Guzmán-Verri, C., González-Barrientos, R., Hernández-Mora, G., Morales, J-A., Baquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Moreno, E. (2012). *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. *Front Cell Infect Microbiol*, 2: 3.
- Hadlow, W.J., Cheville, N.F., Jellison, W.L. (1980). Occurrence of pox in a northern fur seal on the Pribilof Islands in 1951. *J Wildl Dis*, 16(2): 305-312.
- Haller, S.L., Peng, C., McFadden, G., Rothenburg, S. (2014). Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infect Genet Evol*, 21: 15-40.
- Hannant, D., O'Neill, T., Ostlund, E.N., Kydd, J.H., Hopkin, P.J., Mumford, J.A. (1999). Equid herpesvirus-induced immunosuppression is associated with lymphoid cells and not soluble circulating factors. *Viral Immunol*, 12(4): 313-321.
- Harder, T.C., Vos, H.W., de Swart, R.L., Osterhaus, A.D.M.E. (1997). Age-related disease in recurrent outbreaks of phocid herpesvirus type-1 infections in a seal rehabilitation center: Evaluation of diagnostic methods. *Vet Rec*, 140(19): 500-503.
- Hardwicke, J.T., Titley, O.G. (2016). Thermographic Assessment of a Vascular Malformation of the Hand: A New Imaging Modality. *J Clin Imaging Sci*, 6: 9.

- Hardy, J.D. (1934). The radiation of heat from the human body. III. The human skin as a black body radiator. *J Clin Investig*, 13(4): 615-620.
- Hargis, A.M., Ginn, P.E., Mansell, J.E.K.L., Garber, R.L. (1999). Ulcerative facial and nasal dermatitis and stomatitis in cats associated with feline herpesvirus 1. *Vet Dermatol*, 10(4): 267-274.
- Harper, G.J. (1961). Airborne micro-organisms: survival tests with four viruses. *J Hyg*, 59: 479-486.
- Harper, C.M., Dangler, C.A., Xu, S., Feng, Y., Shen, Z., Sheppard, B., Stamper, A., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Fox, J.G. (2000). Isolation and characterization of a *Helicobacter* sp. from the gastric mucosa of dolphins, *Lagenorhynchus acutus* and *Delphinus delphis*. *Appl Environ Microbiol*, 66(11): 4751-4757.
- Harper, C.M., Xu, S., Feng, Y., Dunn, J.L., Taylor, N.S., Dewhirst, F.E., Fox, J.G. (2002a). Identification of novel *Helicobacter* spp. from a beluga whale. *Appl Environ Microbiol*, 68(4): 2040-2043.
- Harper, C.M., Feng, Y., Xu, S., Taylor, N.S., Kinsel, M., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Greenwell, M., Levine, G., Rogers, A., Fox, J.G. (2002b). *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. *J Clin Microbiol*, 40(12): 4536-4543.
- Harper, C.G., Whary, M.T., Feng, Y., Rhinehart, H.L., Wells, R.S., Xu, S., Taylor, N.S., Fox, J.G. (2003). Comparison of diagnostic techniques for *Helicobacter cetorum* infection in wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Clin Microbiol*, 41(7): 2842-2848.
- Hart, L.B., Rotstein, D.S., Wells, R.S., Allen, J., Barleycorn, A., Balmer, B.C., Lane, S.M., Speakman, T., Zolman, E.S., Stolen, M., McFee, W., Goldstein, T., Rowles, T.K., Schwacke, L.H. (2012). Skin lesions on common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from three sites in the Northwest Atlantic, USA. *PLoS One*, 7(3): e33081.
- Head, J.F., Elliot, R.L. (1997). Thermography. Its relation to pathologic characteristics, vascularity, proliferation rate, and survival of patients with invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer*, 79(1): 186-188.
- Hernández-Mora, G., González-Barrientos, R., Morales, J.A., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Barquero-Calvo, E., De-Miguel, M.J., Marín, C.M., Blasco, J.M., Moreno, E. (2008). Neurobrucellosis in stranded dolphins, Costa Rica. *Emerg Infect Dis*, 14(9): 1430-1433.
- Hicks, B.D., Worthy, G.A. (1987). Sealpox in captive grey seals (*Halichoerus grypus*) and their handlers. *J Wildl Dis*, 23(1): 1-6.
- Higgins R, Claveau R, Roy R. (1980). Bronchopneumonia caused by *Streptococcus equi* in a North Atlantic pilot whale (*Globicephala melaena*). *J Wildl Dis*, 16: 319-321.
- Higgins, R. (2000). Bacteria and fungi of marine mammals: a review. *Can Vet J*, 41(2): 105-116.

- Hillenbrand, F.K.M., Rostock, M.D. (1953). **Whale finger and seal finger their relation to erysipeloid.** *Lancet*, 1(6762): 680-681.
- Hildebrandt, C., Raschner, C., Ammer, K. (2010). **An overview of recent application of medical infrared thermography in sports medicine in Austria.** *Sensors*, 10(5): 4700-4715.
- Hilsberg-Merz, S. (2007). **Infrared thermography in zoo and wild animals.** En *Zoo and wild animal medicine, current therapy*. Vol. 6. (M.E. Fowler, R.E. Miller, Eds.), pp. 20-32. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Himworth, C.G., Haulena, M., Lambourn, D.M., Gaydos, J.K., Huggins, J., Calambokidis, J., Ford, J.K., Zaremba, K., Raverty, S. (2010). **Pathology and epidemiology of phocid herpesvirus-1 in wild and rehabilitating harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*) in the northeastern Pacific.** *J Wildl Dis*, 46(3): 1046-1051.
- Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Webster, R.G., Rehg, J.E., Fiorelli, P., Early, G., Geraci, J.R., St Aubin, D.J. (1984). **Are seals frequently infected with avian influenza viruses?.** *J Virol*, 51(3): 863-865.
- Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Geraci, J., Fiorelli, P., Early, G., Webster, R.G. (1986). **Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale.** *J Virol*, 58(2): 655-656.
- Hoare, R., Thompson, K.D., Herath, T., Collet, B., Bron, J.E., Adams, A. (2016). **Development, characterisation and application of monoclonal antibodies for the detection and quantification of infectious salmon anaemia virus in plasma samples using Luminex bead array technology.** *PLoS One*, 11(7): e0159155.
- Hoorens, J.K., Devriese, L., Thoonen, H., Lescrauwaet, A., Hoste, L. (1988). **Septicemische vlekziekte bij een dolfijn** (En holandés, "*Erysipelotrix septicemia* in a dolphin"). *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr*, 57(1): 62-64.
- Hosaki, Y., Mitsunobu, F., Ashida, K., Tsugeno, H., Okamoto, M., Nishida, N., Takata, S., Yokoi, T., Tanizaki, Y., Ochi, K., Tsuji, T. (2002). **Non-invasive study for peripheral circulation in patients with diabetes mellitus.** *Annu Rep Misasa Med Branch*, 72: 31-37.
- Houdas, Y., Ring, E.F.J. (1982). *Human body temperature*, pp. 238. Plenum Press, New York.
- Howard, E.B., Britt, J.O., Matsumoto, G.K., Ithara, R., Nagano, C.N. (1983). **Bacterial diseases.** En *Pathobiology of Marine Mammal Diseases*. (E.B. Howard, Ed.), pp. 69-118. CRC Press, Boca Raton.
- Hunt, T.D., Ziccardi, M.H., Gulland, F.M.D., Yochem, P.K., Hird, D.W., Rowles, T., Mazet, J.A.K. (2008). **Health risks for marine mammal workers.** *Dis Aquat Org*, 81(1): 81-92.

- Hunter, J.E., Duignan, P.J., Dupont, C., Fenwick, S.G., Murray, A. (1998). **First report of potentially zoonotic tuberculosis in fur seals in New Zealand.** *N Z Med J*, 111: 130-131.
- Hsu, C.C., Wobus, C.E., Steffen, E.K., Riley, L.K., Livingston, R.S. (2005). **Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice.** *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(10): 1145-1151.
- Imada, Y., Mori, Y., Daizoh, M., Kudoh, K., Sakano, T. (2003). **Enzyme-linked immunosorbent assay employing a recombinant antigen for detection of protective antibody against swine erysipelas.** *J Clin Microbiol*, 41(11): 5015-5021.
- Inoshima, Y., Murakami, T., Ishiguro, N., Hasegawa, K., Kasamatsu, M. (2013). **An outbreak of lethal adenovirus infection among different otariid species.** *Vet Microbiol*, 165(3-4): 455-459.
- Ishigaki, T., Ikeda, M., Asai, H., Sakuma, S. (1989). **Forehead back thermal ratio for the interpretation of infrared imaging of spinal cord lesions and other neurological disorders.** *Thermol Int*, 3: 101-107.
- Isidoro-Ayza, M., Ruiz-Villalobos, N., Pérez, L., Guzmán-Verri, C., Muñoz, P.M., Alegre, F., Barberán, M., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., González-Barrientos, R., Moreno, E., Blasco, J.M., Domingo, M. (2014). ***Brucella ceti* infection in dolphins from the Western Mediterranean sea.** *BMC Vet Res*, 10: 206.
- Islam, A.F., Wong, C.W., Walkden-Brown, S.W., Colditz, I.G., Arzey, K.E., Groves, P.J. (2002). **Immunosuppressive effects of Marek's disease virus (MDV) and herpesvirus of turkeys (HVT) in broiler chickens and the protective effect of HVT vaccination against MDV challenge.** *Avian Pathol*, 31(5): 449-461.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). **The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4.** [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Consultado el 19 de Abril de 2016.
- Jacob, J.M., West, K.L., Levine, G., Sanchez, S., Jensen, B.A. (2016). **Initial characterization of novel beaked whale morbillivirus in Hawaiian cetaceans.** *Dis Aquat Organ*, 117(3): 215-227.
- Jahans, K.L., Foster, G., Broughton, E.S. (1997). **The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals.** *Vet Microbiol*, 57(4): 373-382.
- Jasmin, C., Powell, C.P., Baucom, J.N. (1972). **Actinomycotic mycetoma in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) due to *Nocardia paraguayensis*.** *Vet Med Small Anim Clin*, 67(5): 542-543.
- Jauniaux, T., Charlier, G., Desmecht, M., Coignoul, F. (1998). **Lesions of morbillivirus infection in a fin whale (*Balaenoptera physalus*) stranded along the Belgian coast.** *Vet Rec*, 143(15): 423-424.

- Jauniaux, T., Petitjean, D., Brenez, C., Borrens, M., Brosens, L., Haelters, J., Tavernier, T., Coignoul, F. (2002). Post-mortem findings and causes of death of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded from 1990 to 2000 along the coastlines of Belgium and Northern France. *J Comp Pathol*, 126(4): 243-253.
- Jellison, W.L., Milner, K.C. (1958). Salmonellosis (bacillary dysentery) of fur seals. *J Wildl Manage*, 22: 199-200.
- Jepson, P.D., Brew, S., MacMillan, A.P., Baker, J.R., Barnett, J., Kirkwood, J.K., Kuiken, T., Robinson, I.R., Simpson, V.R. (1997). Antibodies to *Brucella* in marine mammals around the coast of England and Wales. *Vet Rec*, 141(20): 513-515.
- Jepson, P.D., Baker, J.R., Kuiken, T., Simpson, V.R., Kennedy, S., Bennett, P.M. (2000). Pulmonary pathology of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in England and Wales between 1990 and 1996. *Vet Rec*, 146(25): 721-728.
- Johnson, S.R., Rao, S., Hussey, S.B., Morley, P.S., Traub-Dargatz, J.L. (2011). Thermographic eye temperature as an index to body temperature in ponies. *J Equine Vet Sci*, 31(2): 63-66.
- Jones, B. (1998). A reappraisal of the use of infrared thermal image analysis in medicine. *IEEE T Med Imaging*, 17(6): 1019-1027.
- Kaczmarek, M., Nowakowski, A., Siebert, J., Rogowski, J. (1999). Infrared thermography: applications in heart surgery. *Proc SPIE*, 3730: 184-188.
- Karlsson, E.A., Ip, H.S., Hall, J.S., Yoon, S.W., Johnson, J., Beck, M.A., Webby, R.J., Schultz-Cherry, S. (2014). Respiratory transmission of an avian H3N8 influenza virus isolated from a harbour seal. *Nat Commun*, 5: 4791.
- Katsumata, E. (2010). Study on reproduction of captive marine mammals. *J Reprod Dev*, 56(1): 1-8.
- Keck, N., Kwiatek, O., Dhermain, F., Dupraz, F., Boulet, H., Danes, C., Laprie, C., Perrin, A., Godenir, J., Micout, L., Libeau, G. (2010). Resurgence of Morbillivirus infection in Mediterranean dolphins off the French coast. *Vet Rec*, 166(21): 654-655.
- Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., McCullough, S.J., Allan, G.M., McQuaid, S. (1988). Viral distemper now found in porpoises. *Nature*, 336(6194): 21.
- Kennedy, S., Lindstedt, I.J., McAliskey, M.M., McConnell, S.A., McCullough, S.J. (1992). Herpesviral encephalitis in a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Zoo Wildl Med*, 23(3): 374-379.
- Kennedy, S. (1998). Morbillivirus infections in aquatic mammals. *J Comp Pathol*, 119(3): 201-225.
- Kennedy, S., Kuiken, T., Jepson, P.D., Deaville, R., Forsyth, M., Barrett, T., van de Bildt, M.W.G., Osterhaus, A.D.M.E., Eybatov, T., Duck, C., Kydyrmanov, A., Mitrofanov, I., Wilson, S. (2000). Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging Infect Dis*, 6(6): 637-639.



- Kennedy-Stoskopf, S., Stoskopf, M.K., Eckhaus, M.A., Strandberg, J.D. (1986). Isolation of a retrovirus and a herpesvirus from a captive California sea lion. *J Wildl Dis*, 22(2): 156-164.
- Kennedy-Stoskopf, S. (2001). Viral diseases. En *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Second edition*. (L.A. Dierauf, F.M.D. Gulland), pp. 285-307. CRC Press, Boca Raton.
- Ketterer, P.J., Rosenfeld, L.E. (1974). Septic embolic nephritis in a dolphin caused by *Staphylococcus aureus*. *Aust Vet J*, 50(3): 123.
- Keyserlingk, J.R., Ahlgren, P.D., Yu, E., Belliveau, N. (1998). Infrared imaging of the breast; initial reappraisal using high-resolution digital technology in 100 successive cases of stage I and II breast cancer. *Breast J*, 4(4): 245-251.
- Khan, I.H., Kendall, L.V., Ziman, M., Wong, S., Mendoza, S., Fahey, J., Griffey, S.M., Barthold, S.W., Luciw, P.A. (2005). Simultaneous serodetection of 10 highly prevalent mouse infectious pathogens in a single reaction by multiplex analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(4): 513-519.
- Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelts, B., Van Soolingen, D., Koeter, G. (2008). Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *Int J Tuberc Lung Dis*, 12(12): 1469-1473.
- King, D.P., Parselles, R., Gulland, F.M., Lapointe, J.M., Lowenstine, L.J., Ferrick, D.A., Stott, J.L. (1998). Antigenic and nucleotide characterization of a herpesvirus isolated from Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardsii*). *Arch Virol*, 143(10): 2021-2027.
- Kinoshita, R., Brook, F., Vedros, N., Wad, H.S., Lung, R., Ng, T., Tao, L.Y., Yuen, C.S. (1994). Staphylococcal isolations and clinical cases of *Staphylococcus aureus* in bottlenose dolphins at Ocean Park, Hong Kong. En *Proc 25th Annu Workshop Int Assoc Aquat Anim Med*, 159.
- Kinsel, M.J., Boehm, J.R., Harris, B., Murnane, R.D. (1997). Fatal *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia in a captive Pacific white-sided dolphin. *J Zoo Wildl Med*, 28(4): 494-497.
- Kirchgessner, M.S., Freer, H., Whipps, C.M., Wagner, B. (2013). Detection of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein antibodies in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in New York and Pennsylvania, USA. *Vet Immunol Immunopathol*, 153(1-2): 165-169.
- Kosus, N., Kosus, A., Duran, M., Simavli, S., Turhan, N. (2010). Comparison of standard mammography with digital mammography and digital infrared thermal imaging for breast cancer screening. *J Turk Ger Gynecol Assoc*, 11(3): 152-157.
- Kriz, P., Kralik, P., Slany, M., Slana, I., Svobodova, J., Parmova, I., Barnet, V., Jurek, V., Pavlik, I. (2011). *Mycobacterium pinnipedii* in a captive Southern sea lion (*Otaria flavescens*): a case report. *Veterinari Medicina*, 56(6): 307-313.

- Krog, J.S., Hansen, M.S., Holm, E., Hjulsager, C.K., Chriél, M., Pedersen, K., Andresen, L.O., Abildstrøm, M., Jensen, T.H., Larsen, L.E. (2015). **Influenza A (H10N7) virus in dead harbor seals, Denmark.** *Emerg Infect Dis*, 21(4): 684-687.
- Kuiken, T., Kennedy, S., Barrett, T., Van de Bildt, M.W., Borgsteede, F.H., Brew, S.D., Codd, G.A., Duck, C., Deaville, R., Eybatov, T., Forsyth, M.A., Foster, G., Jepson, P.D., Kydyrmanov, A., Mitrofanov, I., Ward, C.J., Wilson, S., Osterhaus, A.D. (2006). **The 2000 canine distemper epidemic in Caspian seals (*Phoca caspica*): pathology and analysis of contributory factors.** *Vet Pathol*, 43(3): 321-338.
- Lacave, G., Cox, E., Hermans, J., Devriese, L., Goddeeris, B.M. (2001). **Induction of cross-protection in mice against dolphin *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates with a swine commercial vaccine.** *Vet Microbiol*, 80(3): 247-253.
- Lai, H.S., Duh, Y.C., Tsai, W.S., Sun, W.Z. (1998). **Role of thermography in the diagnosis of undescended testes.** *Eur Urol*, 33(2): 209-213.
- Lambertsen, R.H., Kohn, B.A., Sundberg, J.P., Buergelt, C.D. (1987). **Genital papillomatosis in sperm whale bulls.** *J Wildl Dis*, 23(3): 361-367.
- Lambourn, D.M., Garner, M., Ewalt, D., Raverty, S., Sidor, I., Jeffries, S.J., Rhyan, J., Gaydos, J.K. (2013). ***Brucella pinnipedialis* infections in Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*) from Washington State, USA.** *J Wildl Dis*, 49(4): 802-815.
- Lamere, S.A., St Leger, J.A., Schrenzel, M.D., Anthony, S.J., Rideout, B.A., Salomon, D.R. (2009). **Molecular characterization of a novel gammaretrovirus in killer whales (*Orcinus orca*).** *J Virol*, 83(24): 12956-12967.
- Lang, G., Gagnon, A., Geraci J.R. (1981). **Isolation of an influenza A virus from seals.** *Arch Virol*, 68(3-4): 189-195.
- Langenhorst, R.J., Lawson, S., Kittawornrat, A., Zimmerman, J.J., Sun, Z., Li, Y., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Fang, Y. (2012). **Development of a fluorescent microsphere immunoassay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using oral fluid samples as an alternative to serum-based assays.** *Clin Vaccine Immunol*, 19(2): 180-189.
- Larska, M., Polak, M.P., Liu, L., Alenius, S., Uttenthal, A. (2013). **Comparison of the performance of five different immunoassays to detect specific antibodies against emerging atypical bovine pestivirus.** *J Virol Methods*, 187(1): 103-109.
- Lauckner, G. (1985). **Diseases of Mammalia: Pinnipedia, Vol IV.** En *Diseases of marine animals*. (O. Kinne, Ed.), pp. 695-707. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg.
- Lavery, L.A., Higgins, K.R., Lancot, D.R., Constantinides, G.P., Zamorano, R.G., Athanasiou, K.A., Armstrong, D.G., Agrawal, C.M. (2007). **Preventing diabetic foot ulcer recurrence in high-risk patients.** *Diabetes Care*, 30(1): 14-20.
- Leblanc, N., Gantelius, J., Schwenk, J.M., Ståhl, K., Blomberg, J., Andersson-Svahn, H., Belák, S. (2009). **Development of a magnetic bead microarray for simultaneous and simple detection of four pestiviruses.** *J Virol Methods*, 155(1): 1-9.

- LeBlanc, N., Cortey, M., Fernandez Pinero, J., Gallardo, C., Masembe, C., Okurut, A.R., Heath, L., van Heerden, J., Sánchez-Vizcaino, J.M., Ståhl, K., Belák, S. (2013). Development of a suspension microarray for the genotyping of African swine fever virus targeting the SNPs in the C-terminal end of the p72 gene region of the genome. *Transbound Emerg Dis*, 60(4): 378-383.
- Lecis, R., Tocchetti, M., Rotta, A., Naitana, S., Ganges, L., Pittau, M., Alberti, A. (2014). First gammaherpesvirus detection in a free-living Mediterranean bottlenose dolphin. *J Zoo Wildl Med*, 45(4): 922-925.
- Lewis, J.C.M. (1987). Cutaneous mycobacteriosis in a Southern sea lion. *Aquat Mammals*, 13(3): 105-108.
- Lim, M.J., Kwon, S.R., Jung, K.H., Joo, K., Park, S.G., Park, W. (2014). Digital thermography of the fingers and toes in Raynaud's phenomenon. *J Korean Med Sci*, 29(4): 502-506.
- Lin, K., Wang, C., Murtaugh, M., Ramamoorthy, S. (2011). Multiplex method for simultaneous serological detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *J Clin Microbiol*, 49(9): 3184-3190.
- Lindmark, R., Thorén-Tolling, K., Sjöquist, J. (1983). Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J Immunol Methods*, 62(1): 1-13.
- Liong, E., Hammond, D.D., Vedros, N.A. (1985). *Pseudomonas pseudomallei* infection in a dolphin (*Tursiops gilli*): A case report. *Aquat Mamm*, 1: 20-22.
- Lipscomb, T.P., Kennedy, S., Moffett, D., Ford, B.K. (1994). Morbilliviral disease in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Gulf of Mexico. *J Wildl Dis*, 30(4): 572-576.
- Lipscomb, T.P., Habecker, P.L., Dambach, D.M., Schoelkopf, R. (1996a). Genital herpesvirus infection in a male harbor porpoise. En *Proc 1996 Int Assoc Aquat Anim Med 27th Annu Conf*. (Donald, A.A., Ed.), p. 21. Chattanooga, Tennessee.
- Lipscomb, T.P., Kennedy, S., Moffett, D., Krafft, A., Klaunberg, B.A., Lichy, J.H., Regan, G.T., Worthy, G.A., Taubenberger, J.K. (1996b). Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the Gulf of Mexico. *J Vet Diagn Invest*, 8(3): 283-290.
- Lipscomb, T.P., Scott, D.P., Garber, R.L., Krafft, A.E., Tsai, M.M., Lichy, J.H., Taubenberger, J.K., Schulman, F.Y., Gulland, F.M. (2000a). Common metastatic carcinoma of California sea lions (*Zalophus californianus*): evidence of genital origin and association with novel gammaherpesvirus. *Vet Pathol*, 37(6): 609-617.
- Lipscomb, T.P., Mense, M.G., Habecker, P.L., Taubenberger, J.K., Schoelkopf, R. (2000b). Morbilliviral dermatitis in seals. En *Proc Joint Conf American Assoc Zoo Vet and Int Assoc Aquat Anim Med*, New Orleans, 337-338.
- Loriaux, C. (1975). Role of thermography in gynecology. *J Radiol Electrol Med Nucl*, 56(Suppl.1): 57-58.

- Ludes-Wehrmeister, E., Dupke, C., Harder, T.C., Baumgärtner, W., Haas, L., Teilmann, J., Dietz, R., Jensen, L.F., Siebert, U. (2016). **Phocine distemper virus (PDV) seroprevalence as predictor for future outbreaks in harbour seals.** *Vet Microbiol*, 183: 43-49.
- Lvov, D.K., Zdanov, V.M., Sazonov, A.A., Braude, N.A., Vladimirtceva, E.A., Agafonova, L.V., Skljanskaja, E.I., Kaverin, N.V., Reznik, V.I., Pysina, T.V., Oserovic, A.M., Berzin, A.A., Mjasnikova, I.A., Podcernjaeva, R.Y., Klimenko, S.M., Andrejev, V.P., Yakhno, M.A. (1978). **Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales.** *Bull World Health Organ*, 56(6): 923-930.
- Lyons, C., Welsh, M.J., Thorsen, J., Ronald, K., Rima, B.K. (1993). **Canine distemper virus isolated from a captive seal.** *Vet Rec*, 132(19): 487-488.
- Mabuchi, K., Chinzei, T., Fujimasa, I., Haeno, S., Motomura, K., Abe, Y., Yonezawa, T. (1998). **Evaluating asymmetrical thermal distributions through image processing.** *IEEE Eng Med Biol Mag*, 17(4): 47-55.
- Maclachlan, N.J., Dubovi, E.J. (2011a). **Herpesvirales.** En *Fenner's Veterinary Virology. Fourth edition.* (N.J. Maclachlan, E.J. Dubovi), pp. 179-201. Elsevier, Oxford.
- Maclachlan, N.J., Dubovi, E.J. (2011b). **Poxviridae.** En *Fenner's Veterinary Virology. Fourth edition.* (N.J. Maclachlan, E.J. Dubovi), pp. 151-165. Elsevier, Oxford.
- Maio, E., Begeman, L., Bisselink, Y., van Tulden, P., Wiersma, L., Hiemstra, S., Ruuls, R., Gröne, A., Roest, H.I., Willemsen, P., van der Giessen, J. (2014). **Identification and typing of *Brucella* spp. in stranded harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) on the Dutch coast.** *Vet Microbiol*, 173(1-2): 118-124.
- Malafaia, O., Brioschi, M.L., Aoki, S.M., Dias, F.G., Gugelmin, B.S., Aoki, M.S., Aoki, Y.S. (2008). **Infrared imaging contribution for intestinal ischemia detection in wound healing.** *Acta Cir Bras*, 23(6): 511-519.
- Maness, H.T., Nollens, H.H., Jensen, E.D., Goldstein, T., LaMere, S., Childress, A., Sykes, J., St Leger, J., Lacave, G., Latson, F.E., Wellehan, J.F.Jr. (2011). **Phylogenetic analysis of marine mammal herpesviruses.** *Vet Microbiol*, 149(1-2): 23-29.
- Manginas, A., Andreanides, E., Leontiadis, E., Sfyrakis, P., Maounis, T., Degiannis, D., Alivizatos, P., Cokkinos, D. (2010). **Right ventricular endocardial thermography in transplanted and coronary artery disease patients: first human application.** *J Invasive Cardiol*, 22(9): 400-404.
- Manire, C.A., Smolarek, K.A., Romero, C.H., Kinsel, M.J., Clauss, T.M., Byrd, L. (2006). **Proliferative dermatitis associated with a novel alphaherpesvirus in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*).** *J Zoo Wildl Med*, 37(2): 174-181.
- Maratea, J., Ewalt, D.R., Frasca, S.Jr., Dunn, J.L., De Guise, S., Szkudlarek, L., St Aubin, D.J., French, R.A. (2003). **Evidence of *Brucella* sp. infection in marine mammals stranded along the coast of southern New England.** *J Zoo Wildl Med*, 34(3): 256-261.

- Martineau, D., Lagace, A., Beland, P., Higgins, R., Armstrong, D., Shugart, L.R. (1988). Pathology of stranded beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. *J Comp Pathol*, 98(3): 287-311.
- Mass, A.M., Supin, A.Y. (2007). Adaptive features of aquatic mammals' eye. *Anat Rec*, 290(6): 701-715.
- Mauck, B., Bilgmann, K., Jones, D.D., Eysel, U., Dehnhardt, G. (2003). Thermal windows on the trunk of hauled-out seals: hot spots for thermoregulatory evaporation?. *J Exp Biol*, 206: 1727-1738.
- Mazzariol, S., Marcer, F., Mignone, W., Serracca, L., Gorla, M., Marsili, L., Di Guardo, G., Casalone, C. (2012). Dolphin Morbillivirus and *Toxoplasma gondii* coinfection in a Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *BMC Vet Res*, 8: 20.
- Mazzariol, S., Peletto, S., Mondin, A., Centelleghes, C., Di Guardo, G., Di Francesco, C.E., Casalone, C., Acutis, P.L. (2013). Dolphin morbillivirus infection in a captive harbor seal (*Phoca vitulina*). *J Clin Microbiol*, 51(2): 708-711.
- Mazzariol, S., Centelleghes, C., Beffagna, G., Povinelli, M., Terracciano, G., Cocumelli, C., Pintore, A., Denurra, D., Casalone, C., Pautasso, A., Di Francesco, C.E., Di Guardo, G. (2016). Mediterranean fin whales (*Balaenoptera physalus*) threatened by dolphin morbillivirus. *Emerg Infect Dis*, 22(2): 302-305.
- McCafferty, D.J. (2007). The value of infrared thermography for research on mammals: previous applications and future directions. *Mammal Review*, 37(3): 177-255.
- McCafferty, D.J., Gilbert, C., Paterson, W., Pomeroy, P.P., Thompson, D., Currie, J.I., Ancel, A. (2011). Estimating metabolic heat loss in birds and mammals by combining infrared thermography with biophysical modelling. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 158(3): 337-345.
- McCullough, S.J., McNeilly, F., Allan, G.M., Kennedy, S., Smyth, J.A., Cosby, S.L., McQuaid, S., Rima, B.K. (1991). Isolation and characterisation of a porpoise morbillivirus. *Arch Virol*, 118(3-4): 247-252.
- Medway, W., Schryver, H.F. (1973). Respiratory problems in captive small cetaceans. *J Am Vet Med Assoc*, 163(6): 571-573.
- Melero, M., Casado, S., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2009a). Aplicación de la termografía en la valoración de la fertilidad en huevos de cernícalo primilla. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias (RCCV)*, 3(2): 60-68.
- Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2009b). Aplicación de la termografía para el estudio de los koalas. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias (RCCV)*, 3(2): 51-59.
- Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2010). Aplicación de la termografía a la fauna salvaje. *Profesión Veterinaria*, 17(74): 78-83.
- Melero, M., Rubio-Guerri, C., Crespo, J.L., Arbelo, M., Vela, A.I., García-Párraga, D., Sierra, E., Domínguez, L., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2011). First case of erysipelas in a



- free-ranging bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) stranded in the Mediterranean Sea. *Dis Aquat Org*, 97(2): 167-170.
- Melero, M., González, F., Nicolás, O., López, I., Jiménez, M.A., Jato-Sánchez, S., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013). Detection and assessment of electrocution in endangered raptors by infrared thermography. *BMC Vet Res*, 9: 149.
- Melero, M., García-Párraga, D., Corpa, J.M., Ortega, J., Rubio-Guerri, C., Crespo, J.L., Rivera-Arroyo, B., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2014). First molecular detection and characterization of herpesvirus and poxvirus in a Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*). *BMC Vet Res*, 10: 968.
- Melero, M., Crespo-Picazo, J.L., Rubio-Guerri, C., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015). First molecular determination of herpesvirus from two mysticete species stranded in the Mediterranean Sea. *BMC Vet Res*, 11: 283.
- Melero, M., Giménez-Lirola, L.G., Rubio-Guerri, C., Crespo-Picazo, J.L., Sierra, E., García-Párraga, D., García-Peña, F.J., Arbelo, M., Álvaro, T., Valls, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2016). Fluorescent microbead-based immunoassay for anti-*Erysipelothrix rhusiopathiae* antibody detection in cetaceans. *Dis Aquat Org*, 117(3): 237-243.
- Mencucci, R., Mazzotta, C., Corvi, A., Terracciano, L., Rechichi, M., Matteoli, S. (2015). In vivo thermographic analysis of the corneal surface in keratoconic patients undergoing riboflavin-UV-A accelerated cross-linking. *Cornea*, 34(3): 323-327.
- Michaud, A. (1996). Comparison of an infrared ear thermometer to rectal thermometers in cats. *Fel Pract*, 24(6): 25-30.
- Migaki, G., Jones, S.R. (1983). Mycotic diseases in marine mammals. En *Pathobiology of Marine Mammal Diseases. Vol. II*. (E.B. Howard, Ed.), pp. 1-25. CRC, Boca Raton.
- Mihindukulasuriya, K.A., Wu, G., St Leger, J., Nordhausen, R.W., Wang, D. (2008). Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J Virol*, 82(10): 5084-5088.
- Mikaelian, I., Tremblay, M.P., Montpetit, C., Tessaro, S.V., Cho, H.J., House, C., Measures, L., Martineau, D. (1999). Seroprevalence of selected viral infections in a population of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) in Canada. *Vet Rec*, 144(2): 50-51.
- Miller, W.G., Adams, L.G., Ficht, T.A., Cheuible, N.F., Payeur, J.P., Harley, D.R., House, C., Ridgway, S.H. (1999). *Brucella*-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med*, 30(1): 100-110.
- Moeller, R.B.Jr. (2002). Pathology of marine mammals with special reference to infectious diseases. En *New Perspectives: Toxicology and the Environment. Toxicology of Marine Mammals. First edition*. (A. Donald, E. Gardner, J.A.T. Wallace Hayes, Eds.), pp. 3-37. Taylor & Francis Inc., New York.
- Moore, S.E. (2008). Marine mammals as ecosystem sentinels. *J Mammal*, 89(3): 534-540.

- Morgan, P.B., Soh, M.P., Efron, N. (1993). Potential applications of ocular thermography. *Optom Vis Sci*, 70(7): 568-576.
- Morick, D., Kik, M., de Beer, J., van der Zanden, A.G., Houwers, D.J. (2008). Isolation of *Mycobacterium mageritense* from the lung of a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*) with severe granulomatous lesions. *J Wildl Dis*, 44(4): 999-1001.
- Morrison, P. (1962). Body temperatures in some Australian mammals. III. Cetacea (*Megaptera*). *Biol Bull*, 123(1): 154-169.
- Mortola, J.P., Kim, J., Lorzadeh, A., Leur, C. (2015). Thermographic analysis of the radiant heat of chicken and duck eggs in relation to the embryo's oxygen consumption. *J Therm Biol*, 48: 77-84.
- Moser, I., Prodinger, W.M., Hotzel, H., Greenwald, R., Lyashchenko, K.P., Bakker, D., Gomis, D., Seidler, T., Ellenberger, C., Hetzel, U., Wuennemann, K., Moisson, P. (2008). *Mycobacterium pinnipedii*: transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Vet Microbiol*, 127(2-3): 399-406.
- Moss, A.A., Kressel, H.Y., Brito, A.C. (1981). Use of thermography to predict intestinal viability and survival after ischemic injury: a blind experimental study. *Invest Radiol*, 16(1): 24-29.
- Mullan, D.L. (1991). A classification of epidermal lesions observed on the bowhead whale, *Balaena mysticetus*, and the initial steps in the development of a probe for the identification of lesion associated bacteria. Tesis de Máster. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, LA. 84 pp.
- Müller, G., Gröters, S., Siebert, U., Rosenberger, T., Driver, J., König, M., Becher, P., Hetzel, U., Baumgärtner, W. (2003). Parapoxvirus infection in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German North Sea. *Vet Pathol*, 40(4): 445-454.
- Munn, A.J., Barboza, P.S., Dehn, J. (2009). Sensible heat loss from muskoxen (*Ovibos moschatus*) feeding in winter: small calves are not at a thermal disadvantage compared with adult cows. *Physiol Biochem Zool*, 82(5): 455-467.
- Nadel, E.R. (1984). Energy exchanges in water. *Undersea Biomed Res*, 11(2): 149-158.
- Needham, D.J. (1992). Tuberculosis/mycobacteriosis in pinnipeds. En *Proc 23rd Annu Workshop Int Assoc Aquat Anim Med*, 92-96.
- Nettleton, P.F., Munro, R., Pow, I., Gilray, J., Gray, E.W., Reid, H.W. (1995). Isolation of a parapoxvirus from a grey seal (*Halichoerus grypus*). *Vet Rec*, 137(22): 562-564.
- Nielsen, O., Clavijo, A., Boughen, J.A. (2001). Serologic evidence of influenza A infection in marine mammals of arctic Canada. *J Wildl Dis*, 37(4): 820-825.
- Ng, E.Y.K., Kaw, G., Chang, W.M. (2004). Analysis of IR thermal imager for mass blind fever screening. *Microvasc Res*, 68(2): 104-109.

- Ng, E.Y.K., Kaw, G.J.L. (2006). IR images and fever monitoring devices: physics, physiology, and clinical accuracy. En *Medical devices and systems, biomedical engineering handbook. Third edition*. (J.D. Bronizino, Ed.), pp. 1-20. CRC Press, Florida.
- Ng, E.Y.K., Kee, E.C. (2008). Advanced integrated technique in breast cancer thermography. *J Med Eng Technol*, 32(2): 103-114.
- Ng, E.Y.K. (2009). A review of thermography as promising non-invasive detection modality for breast tumor. *Int J Therm Sci*, 48(5): 849-859.
- Ng, E.Y.K., Acharya, R. (2009). Remote-sensing infrared thermography. *IEEE Eng Med Biol*, 28(1): 76-83.
- Ng, W.K., Eng, M., Ng, E.Y.K., Tan, Y.T. (2009). Qualitative study of sexual functioning in couples with erectile dysfunction: Prospective evaluation of the thermography diagnostic system. *J Reprod Med*, 54(11-12): 698-705.
- Nielsen, O., Nielsen, K., Stewart, R.E. (1996). Serologic evidence of *Brucella* spp. exposure in Atlantic walruses (*Odobenus rosmarus rosmarus*) and ringed seals (*Phoca hispida*) of Arctic Canada. *Artic*, 49(4): 383-386.
- Ninomiya, H., Yoshida, E. (2007). Functional anatomy of the ocular circulatory system: vascular corrosion casts of the cetacean eye. *Vet Ophthalmol*, 10(4): 231-238.
- Nogueira, F.E., Medeiros, F.C., Barroso, L.V., Miranda, E.P., de Castro, J.D., Mota Filho, F.H. (2009). Infrared digital telethermography: a new method for early detection of varicocele. *Fertil Steril*, 92(1): 361-362.
- Nollens, H.H., Gulland, F.M., Jacobson, E.R., Hernandez, J.A., Klein, P.A., Walsh, M.T., Condit, R.C. (2006). Parapoxviruses of seals and sea lions make up a distinct subclade within the genus Parapoxvirus. *Virology*, 349(2): 316-324.
- Nollens, H.H., Green, L.G., Duke, D., Walsh, M.T., Chittick, B., Gearhart, S., Klein, P.A., Jacobson, E.R. (2007). Development and validation of monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of immunoglobulin G of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Investig*, 19(5): 465-470.
- Nollens, H.H., Wellehan, J.F., Saliki, J.T., Caseltine, S.L., Jensen, E.D., Van Bonn, W., Venn-Watson, S. (2008). Characterization of a parainfluenza virus isolated from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Vet Microbiol*, 128(3-4): 231-242.
- Odegard, O.A., Krogsrud, J. (1981). Rabies in Svalbard: Infection diagnosed in arctic fox, reindeer and seal. *Vet Rec*, 109(7): 141-142.
- O'Hara, T.M., House, C., House, J.A., Suydam, R.S., George, J.C. (1998). Viral serologic survey of bowhead whales in Alaska. *J Wildl Dis*, 34(1): 39-46.
- Ohishi, K., Ninomiya, A., Kida, H., Park, C.H., Maruyama, T., Arai, T., Katsumata, E., Tobayama, T., Boltunov, A.N., Khuraskin, L.S., Miyazaki, N. (2002). Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiol Immunol*, 46(9): 639-644.

- Ohishi, K., Zenitani, R., Bando, T., Goto, Y., Uchida, K., Maruyama, T., Yamamoto, S., Miyazaki, N., Fujise, Y. (2003). Pathological and serological evidence of *Brucella*-infection in baleen whales (*Mysticeti*) in the western North Pacific. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 26(2): 125-136.
- Ohishi, K., Kishida, N., Ninomiya, A., Kida, H., Takada, Y., Miyazaki, N., Boltunov, A.N., Maruyama, T. (2004). Antibodies to human-related H3 influenza A virus in Baikal seals (*Phoca sibirica*) and ringed seals (*Phoca hispida*) in Russia. *Microbiol Immunol*, 48(11): 905-909.
- Ohno, Y., Inoshima, Y., Maeda, K., Ishiguro, N. (2011). Molecular analysis of parapoxvirus from a spotted seal *Phoca largha* in Japan. *Dis Aquat Organ*, 97(1): 11-16.
- Opriessnig, T., Wood, R.L. (2012). Erysipelas. En *Diseases of swine. Tenth edition.* (J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson, Eds.), pp. 750-759. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Opriessnig, T., Shen, H.G., Bender, J.S., Boehm, J.R., Halbur, P.G. (2013). *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates recovered from fish, a harbour seal (*Phoca vitulina*) and the marine environment are capable of inducing characteristic cutaneous lesions in pigs. *J Comp Pathol*, 148(4): 365-372.
- Osterhaus, A.D., Yang, H., Spijkers, H.E., Groen, J., Teppema, J.S., van Steenis, G. (1985). The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the harbor seal (*Phoca vitulina*). *Arch Virol*, 86(3-4): 239-251.
- Osterhaus, A.D., Broeders, H.W., Visser, I.K., Teppema, J.S., Vedder, E.J. (1990). Isolation of an orthopoxvirus from pox-like lesions of a grey seal (*Halichoerus grypus*). *Vet Rec*, 127(4): 91-92.
- Osterhaus, A.D.M.E., Broeders, H.W.J., Teppema, J.S., Kuiken, T., House, J.A., Vos, H.W., Visser, I.K.G. (1993). Isolation of virus with rhabdovirus morphology from a white-beaked dolphin (*Lagenorhynchus albirostris*). *Arch Virol*, 133(1-2): 189-193.
- Osterhaus, A.D., Broeders, H.W., Visser, I.K., Teppema, J.S., Kuiken, T. (1994). Isolation of a parapoxvirus from pox-like lesions in grey seals. *Vet Rec*, 135(25): 601-602.
- Osterhaus, A.D., de Swart, R.L., Vos, H.W., Ross, P.S., Kenter, M.J., Barrett, T. (1995). Morbillivirus infections of aquatic mammals: newly identified members of the genus. *Vet Microbiol*, 44(2-4): 219-227.
- Osterhaus, A., van de Bildt, M., Vedder, L., Martina, B., Niesters, H., Vos, J., van Egmond, H., Liem, D., Baumann, R., Androukaki, E., Kotomatas, S., Komnenou, A., Abou Sidi, B., Jiddou, A.B., Barham, M.E. (1998). Monk seal mortality: virus or toxin?. *Vaccine*, 16(9-10): 979-981.
- Osterhaus, A.D.M.E., Rimmelzwaan, G.F., Martina, B.E.E., Bestebroer, T.M., Fouchier, R.A.M. (2000). Influenza B virus in seals. *Science*, 288(5468): 1051-1053.
- Otsuka, K., Togawa, T. (1997). Hippocratic thermography. *Physiol Meas*, 18(3): 227-232.

- Pabst, D.A., Rommel, S.A., McLellan, W.A., Williams, T.M., Rowles, T.K. (1995). **Thermoregulation of the intra-abdominal testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during exercise.** *J Exp Biol*, 198: 221-226.
- Page, A. 2010. **Bacterial granulomatous encephalitis in a short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*).** *Pacific Marine Mammal Center, Case Reports in Marine Mammal Pathology*, 1(2): 1-5.
- Park, J., Hyun, J.K., Seo, J. (2007). **The effectiveness of digital infrared thermographic imaging in patients with shoulder impingement syndrome.** *J Shoulder Elbow Surg*, 16(5): 548-554.
- Parsons, E.C.M., Jefferson, T.A. (2000). **Post-mortem investigations of stranded dolphins and porpoises from Hong Kong waters.** *J Wildl Dis*, 36(2): 342-356.
- Pascual, C., Foster, G., Alvarez, N., Collins, M.D. (1998). ***Corynebacterium phocae* sp. nov., isolated from the common seal (*Phoca vitulina*).** *Int J Syst Bacteriol*, 48(2): 601-604.
- Pearce, G., Blacklaws, B.A., Gajda, A.M., Jepson, P., Deaville, R., Van Bresse, M.F. (2008). **Molecular identification and phylogenetic relationships in poxviruses from cetacean skin lesions.** En *Proceedings of the European Cetacean Society*. (G.J. Pierce, E. Philips, R. Lick, Eds.). 10-12 March 2008. Egmond Aan Zee, The Netherlands.
- Pellet, P.E., Roizman, B. (2013). **Herpesviridae.** En *Fields Virology*. 6a edición (D.M. Knipe, P. Howley, Eds.), pp. 1802-1822. Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Penkert, R.R., Kalejta, R.F. (2011). **Tegument protein control of latent herpesvirus establishment and animation.** *Herpesviridae*, 2(1): 3.
- Pereira, C.S., Amorim, S.D., Santos, A.F.M., Siciliano, S., Moreno, I.M.B., Ott, P.H., Rodrigues, D.P. (2007). ***Vibrio* spp. isolados de mamíferos marinhos capturados na região litorânea do Sudeste ao Sul do Brasil.** (En portugués, “*Vibrio* spp. isolated from marine mammals captured in coastal regions from southwestern to southern Brazil”). *Pesq Vet Bras*, 27(2): 81-83.
- Pérez de Diego, A.C., Sánchez-Cordón, P.J., Pedrera, M., Martínez-López, B., Gómez-Villamandos, J.C., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013). **The use of infrared thermography as a non-invasive method for fever detection in sheep infected with bluetongue virus.** *Vet J*, 198(1): 182-186.
- Perkins, J., Parida, S., Clavijo, A. (2007). **Use of a standardized bovine serum panel to evaluate a multiplexed nonstructural protein antibody assay for serological surveillance of foot-and-mouth disease.** *Clin Vaccine Immunol*, 14(11): 1472-1482.
- Perrett, L.L., Dawson, C.E., Davison, N., Quinney, S. (2004). ***Brucella* infection of lungworms from a harbour porpoise.** *Vet Rec*, 154(25): 800.
- Philippa, J.D., Leighton, F.A., Daoust, P.Y., Nielsen, O., Pagliarulo, M., Schwantje, H., Shury, T., Van Herwijnen, R., Martina, B.E., Kuiken, T., Van de Bildt, M.W.,



- Osterhaus, A.D. (2004). **Antibodies to selected pathogens in free-ranging terrestrial carnivores and marine mammals in Canada.** *Vet Rec*, 155(5): 135-140.
- Pier, A.C., Takayama, A.K., Miyahara, A.Y. (1970). **Cetacean nocardiosis.** *J Wildl Dis*, 6(2): 112-118.
- Pier, A.C., Fitchner, R.E. (1981). **Distribution of serotypes of *Nocardia asteroides* from animal, human and environmental sources.** *J Clin Microbiol*, 13(3): 548-553.
- Provost, A. (1976). **Infection of whales by the swine erysipelas bacillus.** *Nouv Presse Med*, 5(5): 276-277.
- Potter, P. (traductor). (1988). *Hippocrates. Vol. VI: Diseases 3. Internal Affections. Regimen in acute diseases*, pp. 361. Dentro de la colección Loeb Classical Library (tomo 473). Harvard University Press, Cambridge.
- Purslow, C., Wolffsohn, J.S. (2007). **The relation between physical properties of the anterior eye and ocular surface temperature.** *Optom Vis Sci*, 84: 197-201.
- Quinn, P.J., Markey, B.K. (2003). **Pathogenic bacteria.** En *Concise Review of Veterinary Microbiology*. Pp. 16-70. Blackwell Publishing, Ames.
- Ramis, A.J., van Riel, D., van de Bildt, M.W., Osterhaus, A., Kuiken, T. (2012). **Influenza A and B virus attachment to respiratory tract in marine mammals.** *Emerg Infect Dis*, 18(5): 817-820.
- Rand, C.S. (1979). **Nodular suppurative cutaneous cellulitis in a Galapagos sea lion.** *J Wildl Dis*, 11(3): 325-329.
- Ransburgh, R. (2015). **Development of a multiplex fluorescent microsphere immunoassay for diagnosis of the porcine disease complex.** Tesis. Department of Diagnostic Medicine and Pathobiology College of Veterinary Medicine, Kansas State University.
- Rassiwalla, M., Mathur, P., Mathur, R., Farid, K., Shukla, S., Gupta, P.K., Jain, B. (2014). **Evaluation of digital infra-red thermal imaging as an adjunctive screening method for breast carcinoma: a pilot study.** *Int J Surg*, 12(12): 1439-1443.
- Rector, A., Stevens, H., Lacave, G., Lemey, P., Mostmans, S., Salbany, A., Vos, M., Van Doorslaer, K., Ghim, S.J., Rehtanz, M., Bossart, G.D., Jenson, A.B., Van Ranst, M. (2008). **Genomic characterization of novel dolphin papillomaviruses provides indications for recombination within the Papillomaviridae.** *Virology*, 378(1): 151-161.
- Reddy, M.L., Dierauf, L.A., Gulland, F.M.D. (2001). **Marine mammals as sentinels of ocean health.** En *Handbook of marine mammal medicine: health, disease and rehabilitation. Second edition.* (L.A. Dierauf, F.M.D. Gulland, Eds.), pp. 3-13. CRC Press, Boca Raton.
- Reeves, R.R., Folkens, P.A., Stewart, B.S., Clapham, P.J., Powell, J.A. (2005). *Guía de los mamíferos marinos del mundo. National Audubon Society.* pp. 528. Ediciones Omega, Barcelona.

- Rehtanz, M., Ghim, S.J., Rector, A., Van Ranst, M., Fair, P.A., Bossart, G.D., Jenson, A.B. (2006). Isolation and characterization of the first American bottlenose dolphin papillomavirus: *Tursiops truncatus* papillomavirus type 2. *J Gen Virol*, 87(12): 3559-3565.
- Rehtanz, M., Bossart, G.D., Doescher, B., Rector, A., Van Ranst, M., Fair, P.A., Jenson, A.B., Ghim, S.J. (2009). Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) papillomaviruses: vaccine antigen candidates and screening test development. *Vet Microbiol*, 133(1-2): 43-53.
- Rehtanz, M., Ghim, S.J., McFee, W., Doescher, B., Lacave, G., Fair, P.A., Reif, J.S., Bossart, G.D., Jenson, A.B. (2010). Papillomavirus antibody prevalence in free-ranging and captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Wildl Dis*, 46(1): 136-145.
- Rehtanz, M., Bossart, G.D., Fair, P.A., Reif, J.S., Ghim, S.J., Jenson, A.B. (2012). Papillomaviruses and herpesviruses: who is who in genital tumor development of free-ranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)?. *Vet Microbiol*, 160(3-4): 297-304.
- Reid, S.M., Ansell, D.M., Ferris, N.P., Hutchings, G.H., Knowles, N.J., Smith, A.W. (1999). Development of a reverse transcription polymerase chain reaction procedure for the detection of marine caliciviruses with potential application for nucleotide sequencing. *J Virol Methods*, 82(1): 99-107.
- Reid, S.M., King, D.P., Shaw, A.E., Knowles, N.J., Hutchings, G.H., Cooper, E.J., Smith, A.W., Ferris, N.P. (2007). Development of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of marine caliciviruses (genus *Vesivirus*). *J Virol Methods*, 140(1-2): 166-173.
- Reidarson, T.H., McBain, J.F., Dalton, L.M., Rinaldi, M.G. (2001). Mycotic diseases. En *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Second edition*. (L.A. Dierauf, F.M.D. Gulland), pp. 337-352. CRC Press, Boca Raton.
- Reif, J.S., Mazzoil, M.S., McCulloch, S.D., Varela, R.A., Goldstein, J.D., Fair, P.A., Bossart, G.D. (2006). Lobomycosis in Atlantic bottlenose dolphins from the Indian River Lagoon, Florida. *J Am Vet Med Assoc*, 228(1): 104-108.
- Reperant, L.A., Rimmelzwaan, G.F., Kuiken, T. (2009). Avian influenza viruses in mammals. *Rev Sci Tech*, 28(1): 137-159.
- Rexroat, J., Benish, K., Fraden, J. (1999). Clinical accuracy of Vet-Temp™ instant ear thermometer: Comparative study with dogs and cats. [www.mimi12.com/img/Clinical\\_Accuracy.pdf](http://www.mimi12.com/img/Clinical_Accuracy.pdf).
- Righter, D.J., Rurangirwa, F.R., Call, D.R., McElwain, T.F. (2011). Development of a bead-based multiplex PCR assay for the simultaneous detection of multiple *Mycoplasma* species. *Vet Microbiol*, 153(3-4): 246-256.
- Ring, E.F.J. (2000). The discovery of infrared radiation in 1800. *Imaging Sci J*, 48(1): 1-8.

- Ring, E.F.J. (2007). The historical development of temperature measurement in medicine. *Infrared Phys Techn*, 49(3): 297-301.
- Ring, F. (2010). Thermal imaging today and its relevance to diabetes. *J Diabetes Sci Technol*, 4(4): 857-862.
- Ring, F. (2016). The Herschel Heritage to Medical Thermography. *J Imaging*, 2(2): 13.
- Robeck, T., Dalton, L.M., Young, W.G. (1994). Systemic nocardiosis in a 6 week old beluga calf. En *Proc 25th Annu Workshop Int Assoc Aquat Anim Med*, 109.
- Robeck, T.R., Dalton, L.M., Young, W.G. (1995). *Nocardia* spp. induced chronic suppurative osteomyelitis in a beluga whale. En *Proc 26th Annu Workshop Int Assoc Aquat Anim Med*, 28.
- Robson, J.M., McDougall, R., van der Valk, S., Waite, S.D., Sullivan, J.J. (1998). *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an uncommon but ever present zoonosis. *Pathology*, 30(4): 391-394.
- Rodríguez-Prieto, V., Rubio-García, A., Melero, M., García, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013). Identification of the pattern of appearance and development of thermal windows in the skin of juvenile Pacific walruses (*Odobenus rosmarus divergens*) in a controlled environment. *Mar Mamm Sci*, 29(1): 167-176.
- Rommel, S.A., Pabst, D.A., McLellan, W.A., Mead, J.G., Potter, C.W. (1992). Anatomical evidence for a countercurrent heat exchanger associated with dolphin testes. *Anat Rec*, 232(1): 150-156.
- Rommel, S.A., Pabst, D.A., McLellan, W.A. (1993). Functional morphology of the vascular plexuses associated with the cetacean uterus. *Anat Rec*, 237(4): 538-546.
- Rommel, S.A., Pabst, D.A., McLellan, W.A., Williams, T.M., Friedl, W.A. (1994). Temperature regulation of the testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): evidence from colonic temperatures. *J Comp Physiol B*, 164(2): 130-134.
- Ros-García, A., Juste, R.A., Hurtado, A. (2012a). A highly sensitive DNA bead-based suspension array for the detection and species identification of bovine piroplasms. *Int J Parasitol*, 42(2): 207-214.
- Ros-García, A., García-Pérez, A.L., Verdera, J., Juste, R.A., Hurtado, A. (2012b). Monitoring piroplasms infection in three cattle farms in Minorca (Balearic Islands, Spain) with previous history of clinical piroplasmosis. *Vet Parasitol*, 190(3-4): 318-325.
- Roskov, Y., Abucay, L., Orrell, T., Nicolson, D., Flann, C., Bailly, N., Kirk, P., Bourgoign, T., DeWalt, R.E., Decock, W., De Wever, A. (2016). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2016 Annual Checklist. [www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2016](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2016). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X.
- Ross, H.M., Foster, G., Reid, R.J., Jahans, K.L., MacMillan, A.P. (1994). *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet Rec*, 134(14): 359.

- Ross, H.M., Jahans, K.L., MacMillan, A.P., Reid, R.J., Thompson, P.M., Foster, G. (1996). *Brucella* species infection in North Sea seal and cetacean populations. *Vet Rec*, 138(26): 647-648.
- Roth, S.J., Tischer, B.K., Kovacs, K.M., Lydersen, C., Osterrieder, N., Tryland, M. (2013). Phocine herpesvirus 1 (PhHV-1) in harbor seals from Svalbard, Norway. *Vet Microbiol*, 164(3-4): 286-292.
- Rubio-Guerri, C., Melero, M., Esperón, F., Bellière, E.N., Arbelo, M., Crespo, J.L., Sierra, E., García-Párraga, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013a). Unusual striped dolphin mass mortality episode related to cetacean morbillivirus in the Spanish Mediterranean Sea. *BMC Vet Res*, 9: 106.
- Rubio-Guerri, C., Melero, M., Rivera-Arroyo, B., Bellière, E.N., Crespo, J.L., García-Párraga, D., Esperón, F., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013b). Simultaneous diagnosis of Cetacean morbillivirus infection in dolphins stranded in the Spanish Mediterranean sea in 2011 using a novel Universal Probe Library (UPL) RT-PCR assay. *Vet Microbiol*, 165(1-2): 109-114.
- Rubio-Guerri, C., García-Párraga, D., Nieto-Pelegrín, E., Melero, M., Álvaro, T., Valls, M., Crespo, J.L., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015). Novel adenovirus detected in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) suffering from self-limiting gastroenteritis. *BMC Vet Res*, 11: 53.
- Ruhnke, H.L., Madoff, S. (1992). *Mycoplasma phocidae* sp. nov., isolated from harbor seals (*Phoca vitulina* L.). *Int J Syst Bacteriol*, 42(2): 211-214.
- Sacristán, C., Réssio, R.A., Castilho, P., Fernandes, N., Costa-Silva, S., Esperón, F., Daura-Jorge, F.G., Groch, K.R., Kolesnikovas, C.K., Marigo, J., Ott, P.H., Oliveira, L.R., Sánchez-Sarmiento, A.M., Simões-Lopes, P.C., Catão-Dias, J.L. (2016). Lacaziosis-like disease in *Tursiops truncatus* from Brazil: a histopathological and immunohistochemical approach. *Dis Aquat Organ*, 117(3): 229-235.
- Saliki, J.T., Cooper, E.J., Rotstein, D.S., Caseltine, S.L., Pabst, D.A., McLellan, W.A., Govett, P., Harms, C., Smolarek, K.A., Romero, C.H. (2006). A novel gammaherpesvirus associated with genital lesions in a Blainville's beaked whale (*Mesoplodon densirostris*). *J Wildl Dis*, 42(1): 142-148.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third edition. Vol. 2*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Matamoros, A., Beck, C., Kukiela, D., Lecollinet, S., Blaise-Boisseau, S., Garnier, A., Rueda, P., Zientara, S., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015). Development of a microsphere-based immunoassay for serological detection of African horse sickness virus and comparison with other diagnostic techniques. *Transbound Emerg Dis*, 63(6): e270-e277.
- Sánchez-Matamoros, A., Nieto-Pelegrín, E., Beck, C., Rivera-Arroyo, B., Lecollinet, S., Sailleau, C., Zientara, S., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2016). Development of a Luminex-

- based DIVA assay for serological detection of African horse sickness virus in horses. *Transbound Emerg Dis*, 63(4): 353-359.
- Sargent, G.R. (2008). The use of thermography in clinical thoracolumbar disease in Dachshunds. Tesis. Department of Clinical Sciences College of Veterinary Medicine, Kansas State University.
- Sawada, T., Tamura, Y., Takahashi, T. (1987). Effect of cyclophosphamide and carrageenan on resistance of mice to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Microbiol*, 15(4): 341-346.
- Schroeder, J.P., Wallace, J.G., Cates, M.B., Greco, S.B., Moore, P.W. (1985). An infection by *Vibrio alginolyticus* in an Atlantic bottlenose dolphin housed in an open ocean pen. *J Wildl Dis*, 21(4): 437-438.
- Schulman, F.Y., Lipscomb, T.P., Moffett, D., Krafft, A., Lichy, J.H., Tsai, M.M., Taubenberger, J., Kennedy, S. (1997). Re-evaluation of the 1987-88 Atlantic coast bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) mortality event with histologic, immunohistochemical, and molecular evidence for a morbilliviral etiology. *Vet Pathol*, 34: 288-295.
- Seibold, H.R., Neal, J.E. (1956). *Erysipelothrix* septicaemia in the porpoise. *J Am Vet Med Assoc*, 128(11): 537-539.
- Seol, B., Gomercic, M.D., Naglic, T., Gomercic, T., Galov, A., Gomercic, H. (2006). Isolation of *Clostridium tertium* from a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in the Adriatic Sea. *J Wildl Dis*, 42(3): 709-711.
- Shotts, E.B., Albert, T.F., Wooley, R.E., Brown, J. (1990). Microflora associated with the skin of the bowhead whale (*Balaena mysticus*). *J Wildl Dis*, 26(3): 351-359.
- Siebert, U., Joiris, C., Holsbeek, L., Benke, H., Failing, K., Frese, K., Petzinger, E. (1999). Potential relation between mercury concentrations and necropsy findings in cetaceans from German waters of the North and Baltic seas. *Mar Pollut Bull*, 38(4): 285-295.
- Siebert, U., Muller, G., Desportes, G., Weiss, R., Hansen, K., Baumgartner, W. (2002). Pyogranulomatous myocarditis due to *Staphylococcus aureus* septicaemia in two harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Vet Rec*, 150(9): 273-277.
- Siegers, J.Y., van de Bildt, M.W., van Elk, C.E., Schürch, A.C., Tordo, N., Kuiken, T., Bodewes, R., Osterhaus, A.D. (2014). Genetic relatedness of dolphin rhabdovirus with fish rhabdoviruses. *Emerg Infect Dis*, 20(6): 1081-1082.
- Sierra, E., Sánchez, S., Saliki, J.T., Blas-Machado, U., Arbelo, M., Zucca, D., Fernández, A. (2014). Retrospective study of etiologic agents associated with nonsuppurative meningoencephalitis in stranded cetaceans in the Canary Islands. *J Clin Microbiol*, 52(7): 2390-2397.



- Sierra, E., Díaz-Delgado, J., Arbelo, M., Andrada, M., Sacchini, S., Fernández, A. (2015). Herpesvirus-associated genital lesions in a stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in the Canary Islands, Spain. *J Wildl Dis*, 51(3): 696-702.
- Simpson, C.F., Wood, F.G., Young, F. (1958). Cutaneous lesions on a porpoise with erysipelas. *J Am Vet Med Assoc*, 133(11): 558-560.
- Simpson, V.R., Stuart, N.C., Stack, M.J., Ross, H.A., Head, J.C. (1994). Parapox infection in grey seals (*Halichoerus grypus*) in Cornwall. *Vet Rec*, 134(12): 292-296.
- Sinclair, M., Hawkins, A., Testro, A. (2013). Something fishy: an unusual *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in an immunocompromised individual. *BMJ Case Rep*, doi: 10.1136/bcr-2013-008873.
- Sitt, T., Bowen, L., Blanchard, M.T., Gershwin, L.J., Byrne, B.A., Dold, C., McBain, J., Stott, J.L. (2010). Cellular immune responses in cetaceans immunized with a porcine erysipelas vaccine. *Vet Immunol Immunopathol*, 137(2-4): 181-189.
- Sivanandam, S., Anburajan, M., Venkatraman, B., Menaka, M., Sharath, D. (2012). Medical thermography: a diagnostic approach for type 2 diabetes based on non-contact infrared thermal imaging. *Endocrine*, 42(2): 343-351.
- Skaar I, Gaustad P, Tonjum T, Holm B, Stenwig H. (1994). *Streptococcus phocae* sp. nov., a new species isolated from clinical specimens from seals. *Int J Syst Bacteriol*, 44(4): 646-650.
- Smith, A.W., Brown, R.J., Skilling, D.E., DeLong, R.L. (1974). *Leptospira pomona* and reproductive failure in California sea lions. *J Am Vet Med Assoc*, 165(11): 996-998.
- Smith, A.W., Brown, R.J., Skilling, D.E., Bray, H.L., Keyes, M.C. (1977). Naturally occurring leptospirosis in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *J Wildl Dis*, 13(2): 144-148.
- Smith, A.W., Latham, A.B. (1978). Prevalence of vesicular exanthema of swine antibodies among feral mammals associated with the southern California coastal zones. *Am J Vet Res*, 39(2): 291-296.
- Smith, A.W., Vedros, N.A., Akers, T.G., Gilmartin, W.G. (1978). Hazards of disease transfer from marine mammals to land mammals: review and recent findings. *J Am Vet Med Assoc*, 173(9): 1131-1133.
- Smith, A.W., Skilling, D.E. (1979). Viruses and virus diseases of marine mammals. *J Am Vet Med Assoc*, 175(9): 918-920.
- Smith, A.W., Akers, T.G., Latham, A.B., Skilling, D.E., Bray, H.L. (1979). A new calicivirus isolated from a marine mammal. *Arch Virol*, 61(3): 255-259.
- Smith, A.W., Skilling, D.E., Brown, R.J. (1980). Preliminary investigation of a possible lung worm (*Parafilaroides decorus*), fish (*Girella nigricans*), and marine mammals (*Callorhinus ursinus*) cycle for San Miguel sea lion virus type 5. *Am J Vet Res*, 41(11): 1846-1850.

- Smith, A.W., Skilling, D.E., Ridgway, S. (1983). **Calicivirus-induced vesicular disease in cetaceans and probable interspecies transmission.** *J Am Vet Med Assoc*, 183(11): 1223-1225.
- Smith, A.W. (1987). **San Miguel sea lion virus.** En *Virus Infections of Carnivores*. (M. Appel, Ed.), pp. 481-489. Elsevier Science Publication, Amsterdam.
- Smith, A.W., Skilling, D.E., Benirschke, K., Albert, T.F., Barlough, J.E. (1987). **Serology and virology of the bowhead whale (*Balaena mysticetus* L.).** *J Wildl Dis*, 23(1): 92-98.
- Smith, A.W., Boyt, P.M. (1990). **Caliciviruses of ocean origin: A review.** *J Zoo Wildl Med*, 21(1): 3-23.
- Smolarek Benson, K.A., Manire, C.A., Ewing, R.Y., Saliki, J.T., Townsend, F.I., Ehlers, B., Romero, C.H. (2006). **Identification of novel alpha- and gammaherpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales.** *J Virol Methods*, 136(1-2): 261-266.
- Soto, S., González, R., Alegre, F., González, B., Medina, P., Raga, J.A., Marco, A., Domingo, M. (2011a). **Epizootic of dolphin morbillivirus on the Catalanian Mediterranean coast in 2007.** *Vet Rec*, 169(4): 101.
- Soto, S., Alba, A., Ganges, L., Vidal, E., Raga, J.A., Alegre, F., González, B., Medina, P., Zorrilla, I., Martínez, J., Marco, A., Pérez, M., Pérez, B., Pérez De Vargas Mesas, A., Martínez Valverde, R., Domingo, M. (2011b). **Post-epizootic chronic dolphin morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins *Stenella coeruleoalba*.** *Dis Aquat Organ*, 96(3): 187-194.
- Soto, S., Gonzalez, B., Willoughby, K., Maley, M., Olvera, A., Kennedy, S., Marco, A., Domingo, M. (2012). **Systemic herpesvirus and morbillivirus co-infection in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*).** *J Comp Pathol*, 146(2-3): 269-273.
- Sousa, M.G., Carareto, R., Pereira-Junior, V.A., Aquino, M.C. (2011). **Comparison between auricular and standard rectal thermometers for the measurement of body temperature in dogs.** *Can Vet J*, 52(4): 403-406.
- Speakman, J.R., Ward, S. (1998). **Infrared thermography: principles and applications.** *Zoology*, 101(3): 224-232.
- Speck, S.H., Ganem, D. (2010). **Viral latency and its regulation: lessons from the gamma-herpesviruses.** *Cell Host Microbe*, 8(1): 100-115.
- Stack, M.J., Simpson, V.R., Scott, A.C. (1993). **Mixed poxvirus and calicivirus infections of grey seals (*Halichoerus grypus*) in Cornwall.** *Vet Rec*, 132(7): 163-165.
- Stamper, M.A., Gulland, F.M.D., Spraker, T. (1998). **Leptospirosis in rehabilitated Pacific harbor seals in California.** *J Wildl Dis*, 34(2): 407-410.
- Stephens, N., Duignan, P.J., Wang, J., Bingham, J., Finn, H., Bejder, L., Patterson, A.P., Holyoake, C. (2014). **Cetacean morbillivirus in coastal Indo-Pacific bottlenose dolphins, Western Australia.** *Emerg Infect Dis*, 20(4): 666-670.

- Stevens, E., Lipscomb, T.P., Gulland, F.M.D. (1999). An additional case of leptospirosis in a harbor seal. *J Wildl Dis*, 35(1): 150.
- Stenvers, O., Zhang, X.M., Ludwig, H. (1992). Herpesvirus infections in seals: a summary of present knowledge. *Rev Sci Tech*, 11(4): 1151-1154.
- St Leger, J.A., Begeman, L., Fleetwood, M., Frasca, S., Garner, M.M., Lair, S., Trembley, S., Linn, M.J., Terio, K.A. (2009). Comparative pathology of nocardiosis in marine mammals. *Vet Pathol*, 46(2): 299-308.
- St Leger, J., Wu, G., Anderson, M., Dalton, L., Nilson, E., Wang, D. (2011). West Nile virus infection in killer whale, Texas, USA, 2007. *Emerg Infect Dis*, 17(8): 1531-1533.
- Storelli, M.M., Marcotrigiano, G.O. (2003). Levels and congener pattern of polychlorinated biphenyls in the blubber of the Mediterranean bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Environ Int*, 28(7): 559-565.
- Stuen S., Have P., Osterhaus A.D., Arnemo J.M., Moustgaard A. (1994). Serological investigation of virus infections in harp seals (*Phoca groenlandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*). *Vet Rec*, 134(19): 502-503.
- Suer, L.D., Vedros, N.A. (1988). *Erysipelothrix rhusiopathiae*. I. Isolation and characterization from pinnipeds and bite/abrasion wounds in humans. *Dis Aquat Org*, 5: 1-5.
- Sugita, H., Kumazawa, J., Daguchi, Y. (1996). Production of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase by intestinal bacteria of pinnipedian animals. *Lett Appl Microbiol*, 23(5): 275-278.
- Sweeney, J.C. (1974). Common diseases of pinnipeds. *J Am Vet Med Assoc*, 165(9): 805-810.
- Sweeney, J.C., Ridgway, S.H. (1975). Common diseases of small cetaceans. *J Am Vet Med Assoc*, 167(7): 533-540.
- Sweeney, J.C., Miyaki, G., Vainik, P.M., Conklin, R.H. (1976). Systemic mycoses in marine mammals. *J Am Vet Med Assoc*, 169(9): 946-948.
- Sweeney, J.C. (1978). Infectious diseases. En *Zoo and Wild Animal Medicine*. (M.E. Fowler, Ed.), pp. 777. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Sweeney, J.C. (1986). Marine Mammals: Infectious diseases. En *Zoo and Wild Animal Medicine. Second edition*. (M.E. Fowler, Ed.), pp. 777-781. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Tangredi, R.C., Medway, W. (1980). Post-mortem isolation of *Vibrio alginolyticus* from an Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*). *J Wildl Dis*, 16(3): 329-331.
- Taubenberger, J.K., Tsai, M.M., Atkin, T.J., Fanning, T.G., Krafft, A.E., Moeller, R.B., Kodosi, S.E., Mense, M.G., Lipscomb, T.P. (2000). Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). *Emerg Infect Dis*, 6(1): 42-45.

- Terasawa, F., Kataoka, Y., Sawada, T., Takahashi, K., Kitamura, M., Fujimoto, A. (2001). Two cases of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 2 infection in bottlenose dolphins. *Jpn J Zoo Wildl Med*, 6: 67-71.
- Thompson, P.J., Cousins, D.V., Gow, B.L., Collins, D.M., Williamson, B.H., Dagnia, H.T. (1993). Seals, seal trainers, and mycobacterial infection. *Am Rev Respir Dis*, 147(1): 164-167.
- Thorel, M.F., Moutou, F. (1994). Tuberculose et animaux sauvages. *Point Vet*, 26: 27-43.
- Thorel, M.F., Karoui, C., Varnerot, A., Fleury, C., Vincent, V. (1998). Isolation of *Mycobacterium bovis* from baboons, leopards and a sea-lion. *Vet Res*, 29(2): 207-212.
- Thornton, S.M., Nolan, S., Gulland, F.M. (1998). Bacterial isolates from California sea lions (*Zalophus californianus*), harbor seals (*Phoca vitulina*), and northern elephant seals (*Mirounga augustirostris*) admitted to a rehabilitation center along the central California coast, 1994-1995. *J Zoo Wildl Med*, 29(2): 171-176.
- Thurman, G.D., Downes, S.J., Fothergill, M.B., Goodwin, N.M., Hegarty, M.M. (1983). Diagnosis and successful treatment of subacute erysipelas in a captive dolphin. *J S Afr Vet Assoc*, 54(3): 193-200.
- Toplu, N., Aydoğan, A., Oguzoglu, T.C. (2007). Visceral leishmaniosis and parapoxvirus infection in a Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*). *J Comp Pathol*, 136(4): 283-287.
- To, H., Nagai, S. (2007). Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clin Vaccine Immunol*, 14(7): 813-820.
- Tryland, M., Klein, J., Nordøy, E.S., Blix, A.S. (2005). Isolation and partial characterization of a parapoxvirus isolated from a skin lesion of a Weddell seal. *Virus Res*, 108(1-2): 83-87.
- Tsur, I., Goffman, O., Yakobsen, B., Moffett, D., Kennedy, S. (1997). Morbillivirus infection in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Mediterranean Sea. *Eur J Vet Pathol*, 2: 83-85.
- Uematsu, S. (1986). Symmetry of skin temperature comparing one side of the body to other. *Thermology*, 1: 4-7.
- van Beurden SJ, IJsseldijk LL, Ordonez SR, Förster C, de Vrieze G, Gröne A, Verheije MH, Kik M. (2015). Identification of a novel gammaherpesvirus associated with (muco)cutaneous lesions in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Arch Virol*, 160(12): 3115-3120.
- Van Bonn, W., Jensen, E.D., House, C., House, J.A., Burrage, T., Gregg, D.A. (2000). Epizootic vesicular disease in captive California sea lions. *J Wildl Dis*, 36(3): 500-507.
- Van Bresse M.F., Visser, I.K., Van de Bildt, M.W., Teppema, J.S., Raga, J.A., Osterhaus, A.D. (1991). Morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Rec*, 129(21): 471-472.

- Van Bressem, M.F., Van Waerebeek, K., Reyes, J.C., Dekegel, D., Pastoret, P.P. (1993). Evidence of poxvirus in dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*) and Burmeister's porpoise (*Phocoena spinipinnis*) from coastal Peru. *J Wildl Dis*, 29(1): 109-113.
- Van Bressem, M.F., Waerebeek, K.V., Garcia-Godos, A., Dekegel, D., Pastoret, P.P. (1994). Herpes-like virus in dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*, from coastal Peru. *Mar Mamm Sci*, 10(3): 354-359.
- Van Bressem, M.F., Van Waerebeek, K. (1996). Epidemiology of pox virus in small cetaceans from the eastern South Pacific. *Mar Mamm Sci*, 12(3): 371-382.
- Van Bressem, M.F., Van Waerebeek, K., Pierard, G.E., Desaintes, C. (1996). Genital and lingual warts in small cetaceans from coastal Peru. *Dis Aquat Org*, 26(1): 1-10.
- Van Bressem, M.F., Van Waerebeek, K., Fleming, M., Barrett, T. (1998). Serological evidence of morbillivirus infection in small cetaceans from the Southeast Pacific. *Vet Microbiol*, 59(2-3): 89-98.
- Van Bressem, M.F., Van Waerebeek, K., Raga, J.A. (1999). A review of virus infections of cetaceans and the potential impact of morbilliviruses, poxviruses and papillomaviruses on host population dynamics. *Dis Aquat Org*, 38(1): 53-65.
- Van Bressem, M.F., Van Waerebeek, K., Raga, J.A., Godfroid, J., Brew, S.D., MacMillan, A.P. (2001). Serological evidence of *Brucella* species infection in odontocetes from the south Pacific and the Mediterranean. *Vet Rec*, 148(21): 657-661.
- Van Bressem, M.F., Gaspar, R., Aznar, F.J. (2003). Epidemiology of tattoo skin disease in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* from the Sado estuary, Portugal. *Dis Aquat Org*, 56(2): 171-179.
- Van Bressem, M.F., Van Waerebeek, K., Bennett, M. (2006). Orthopoxvirus neutralising antibodies in small cetaceans from the Southeast Pacific. *Lat Am J Aquat Mamm*, 5(1): 49-54.
- Van Bressem, M.F., Cassonnet, P., Rector, A., Desaintes, C., Van Waerebeek, K., Alfaro-Shigueto, J., Van Ranst, M., Orth, G. (2007). Genital warts in Burmeister's porpoises: characterization of *Phocoena spinipinnis* papillomavirus type 1 (PsPV-1) and evidence for a second, distantly related PsPV. *J Gen Virol*, 88(7): 1928-1933.
- Van Bressem, M.F., Van Waerebeek, K., Flach, L., Reyes, J.C., De Oliveira Santos, M.C., Siciliano, S., Echegaray, M., Viddi, F., Félix, F., Crespo, E., Sanino, G.P., Avila, I.C., Fraijia, N., Castro, C. (2008). Skin diseases in cetaceans. Paper SC/60/DW8 of the Scientific Committee of International Whaling Commission. Disponible online: [www.vliz.be/imisdocs/publications/242848.pdf](http://www.vliz.be/imisdocs/publications/242848.pdf).
- Van Bressem, M.F., Waerebeek, K.V., Aznar, F.J., Raga, J.A., Jepson, P.D., Duignan, P., Deaville, R., Flach, L., Viddi, F., Baker, J.R., Di Benedetto, A.P., Echegaray, M., Genova, T., Reyes, J., Felix, F., Gaspar, R., Ramos, R., Peddemors, V., Sanino, G.P., Siebert, U. (2009). Epidemiological pattern of tattoo skin disease: a potential general health indicator for cetaceans. *Dis Aquat Organ*, 85(3): 225-237.



- Van Bresseem, M.F., Minton, G., Collins, T., Willson, A., Baldwin, R., Van Waerebeek, K. (2014a). **Tattoo-like skin disease in the endangered subpopulation of the Humpback Whale, *Megaptera novaeangliae*, in Oman (Cetacea: *Balaenopteridae*)**. *Zoology in the Middle East*, 2014: 1-8.
- Van Bresseem, M.F., Duignan, P.J., Banyard, A., Barbieri, M., Colgrove, K.M., De Guise, S., Di Guardo, G., Dobson, A., Domingo, M., Fauquier, D., Fernández, A., Goldstein, T., Grenfell, B., Groch, K.R., Gulland, F., Jensen, B.A., Jepson, P.D., Hall, A., Kuiken, T., Mazzariol, S., Morris, S.E., Nielsen, O., Raga, J.A., Rowles, T.K., Saliki, J., Sierra, E., Sephens, N., Stone, B., Tomo, I., Wang, J., Waltzek, T., Wellehan, J.F.X. (2014b). **Cetacean morbillivirus: current knowledge and future directions**. *Viruses*, 6(12): 5145-5181.
- van de Bildt, M.W.G., Vedder, E.J., Martina, B.E.E., Sidi, B.A., Jiddou, A.B., Barham, M.E.O., Androukaki, E., Komnenou, A., Niesters, H.G.M., Osterhaus, A.D.M.E. (1999). **Morbilliviruses in Mediterranean monk seals**. *Vet Microbiol*, 69(1-2): 19-21.
- van de Bildt, M.W., Martina, B.E., Vedder, E.J., Androukaki, E., Kotomatas, S., Komnenou, A., Sidi, B.A., Jiddou, A.B., Barham, M.E., Niesters, H.G., Osterhaus, A.D. (2000). **Identification of morbilliviruses of probable cetacean origin in carcasses of Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*)**. *Vet Rec*, 146(24): 691-694.
- van de Bildt, M.W., Martina, B.E., Sidi, B.A., Osterhaus, A.D. (2001). **Morbillivirus infection in a bottlenosed dolphin and a Mediterranean monk seal from the Atlantic coast of West Africa**. *Vet Rec*, 148(7): 210-211.
- van der Wal, .F.J., Achterberg, R.P., Kant, A., Maassen, C.B. (2013). **A bead-based suspension array for the serological detection of *Trichinella* in pigs**. *Vet J*, 196(3): 439-444.
- VanDevanter, D.R., Warrenner, P., Bennett, L., Schultz, E.R., Coulter, S., Garber, R.L., Rose, T.M. (1996). **Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR**. *J Clin Microbiol*, 34(7): 1666-1671.
- van Elk, C.E., van de Bildt, M.W., de Jong, A.A., Osterhaus, A.D., Kuiken, T. (2009). **Herpesvirus in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): cultivation, epidemiology, and associated pathology**. *J Wildl Dis*, 45(4): 895-906.
- van Elk, C.E., van de Bildt, M.W., Jauniaux, T., Hiemstra, S., van Run, P.R., Foster, G., Meerbeek, J., Osterhaus, A.D., Kuiken, T. (2014). **Is dolphin morbillivirus virulent for white-beaked dolphins (*Lagenorhynchus albirostris*)?**. *Vet Pathol*, 51(6): 1174-1182.
- van Elk, C., van de Bildt, M., van Run, P., de Jong, A., Getu, S., Verjans, G., Osterhaus, A., Kuiken, T. (2016). **Central nervous system disease and genital disease in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) are associated with different herpesviruses**. *Vet Res*, 47: 28.
- van Gageldonk, P.G., van Schaijk, F.G., van der Klis, F.R., Berbers, G.A. (2008). **Development and validation of a multiplex immunoassay for the simultaneous**

- determination of serum antibodies to *Bordetella pertussis*, diphtheria and tetanus. *J Immunol Methods*, 335(1-2): 79-89.
- VanPelt, R.W., Dieterich, R.A. (1973). Staphylococcal infection and toxoplasmosis in a young harbor seal. *J Wildl Dis*, 9(3): 258-261.
- Varaldo, P.E., Kilpper-Balz, R., Biavasco, F., Satta, G., Schleifer, K.H. (1988). *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int J Syst Bacteriol*, 38(4): 436-439.
- Vedros, N.A., Smith, A.W., Schonewald, J., Migaki, G., Hubbard, R.C. (1971). Leptospirosis epizootic among California sea lions. *Science*, 172(3989): 1250-1251.
- Venkataramani, K., Mestha, L.K., Ramachandra, L., Prasad, S.S., Kumar, V., Raja, P.J. (2015). Semi-automated breast cancer tumor detection with thermographic video imaging. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2015: 2022-2025.
- Venn-Watson, S., Smith, C.R., Jensen, E.D. (2008). Primary bacterial pathogens in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*: needles in haystacks of commensal and environmental microbes. *Dis Aquat Organ*, 79(2): 87-93.
- Venn-Watson, S., Benham, C., Gulland, F.M., Smith, C.R., St Leger, J., Yochem, P., Nollens, H., Blas-Machado, U., Saliki, J., Colegrove, K., Wellehan, J.F.Jr, Rivera, R. (2012). Clinical relevance of novel Otarine herpesvirus-3 in California sea lions (*Zalophus californianus*): lymphoma, esophageal ulcers, and strandings. *Vet Res*, 43: 85.
- Vijayaraghavan, B., Xia, H., Harimoorthy, R., Liu, L., Belák, S. (2012). Evaluation of envelope glycoprotein Erns of an atypical bovine pestivirus as antigen in a microsphere immunoassay for the detection of antibodies against bovine viral diarrhea virus 1 and atypical bovine pestivirus. *J Virol Methods*, 185(2): 193-198.
- Vilela, R., Bossart, G.D., St Leger, J.A., Dalton, L.M., Reif, J.S., Schaefer, A.M., McCarthy, P.J., Fair, P.A., Mendoza, L. (2016). Cutaneous granulomas in dolphins caused by novel uncultivated *Paracoccidioides brasiliensis*. *Emerg Infect Dis*, 22(12): 2063-2069.
- Visser, I.K., Van Bresse, M.F., de Swart, R.L., van de Bildt, M.W., Vos, H.W., van der Heijden, R.W., Saliki, J.T., Orvell, C., Kitching, P., Kuiken, T., Barrett, T., Osterhaus, A.D.M.E. (1993a). Characterization of morbilliviruses isolated from dolphins and porpoises in Europe. *J Gen Virol*, 74(4): 631-641.
- Visser, I.K., van Bresse, M.F., van de Bildt, M.W., Groen, J., Orvell, C., Raga, J.A., Osterhaus, A.D. (1993b). Prevalence of morbilliviruses among pinniped and cetacean species. *Rev Sci Tech*, 12(1): 197-202.
- Vreugdenburg, T.D., Willis, C.D., Mundy, L., Hiller, J.E. (2013). A systematic review of elastography, electrical impedance scanning, and digital infrared thermography for breast cancer screening and diagnosis. *Breast Cancer Res Treat*, 37(3): 665-676.
- Wada, S., Oishi, M., Yamada, T.K. (2003). A newly discovered species of living baleen whale. *Nature*, 426(6964): 278-281.

- Wagner, B., Freer, H., Rollins, A., Erb, H. (2011a). A fluorescent bead-based multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins in canine serum. *Vet Immunol Immunopathol*, 140(3-4): 190-198.
- Wagner, B., Freer, H., Rollins, A., Erb, H.N., Lu, Z., Grohn, Y. (2011b). Development of a multiplex assay for the detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses and its validation using Bayesian and conventional statistical methods. *Vet Immunol Immunopathol*, 144(3-4): 374-381.
- Wagner, B., Freer, H., Rollins, A., Garcia-Tapia, D., Erb, H.N., Earnhart, C., Marconi, R., Meeus, P. (2012). Antibodies to *Borrelia burgdorferi* OspA, OspC, OspF, and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs. *Clin Vaccine Immunol*, 19(4): 527-535.
- Wagner, B., Goodman, L.B., Rollins, A., Freer, H.S. (2013). Antibodies to OspC, OspF and C6 antigens as indicators for infection with *Borrelia burgdorferi* in horses. *Equine Vet J*, 45(5): 533-537.
- Walsh, M.T., Thomas, L.A., Songer, J.G., Campbell, T.W., Tucker, L.S. (1994). *Clostridium perfringens* isolates from cetaceans. En *Proc 28th Annu Workshokp Int Assoc Aquat Anim Med*, 95.
- Walsh, M.T., Gaynor, E.V. (2001). Thermal imaging of marine mammals. En *CRC handbook of marine mammal medicine. Second edition*. (L. Dierauf, F.M.D. Gulland, Eds.), pp. 643-652. CRC Press, Florida.
- Waltzek, T.B., Cortés-Hinojosa, G., Wellehan Jr., J.F.X., Gray, G.C. (2012). Marine mammal zoonoses: a review of disease manifestations. *Zoonoses Public Health*, 59(8): 521-535.
- Wang, Q., Chang, B.J., Riley, T.V. (2010). *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Microbiol*, 140(3-4): 405-417.
- Wang, L., Yin, Q., He, G., Rossiter, S. J., Holmes, E. C., Cui, J. (2013). Ancient invasion of an extinct gammaretrovirus in cetaceans. *Virology*, 441(1): 66-69.
- Watmough, D.J., Fowler, P.W., Oliver, R. (1970). The thermal scanning of a curved isothermal surface: implications for clinical thermography. *Phys Med Biol*, 15(1): 1-8.
- Watson, D.S., Reddy, S.M., Brahmakshatriya, V., Lupiani, B. (2009). A multiplexed immunoassay for detection of antibodies against avian influenza virus. *J Immunol Methods*, 340(2): 123-131.
- Webster, R.G., Geraci, J.R., Petursson, G., Skirnisson, K. (1981a). Conjunctivitis in human beings caused by influenza A virus of seals. *N Engl J Med*, 304(15): 911.
- Webster, R.G., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., van Wyke, K.L., Geraci, J.R., St Aubin, D.J., Petursson, G. (1981b). Characterization of an influenza A virus from seals. *Virology*, 113(2): 712-724.
- Wells, S.K., Gutter, A., Van Meter, K. (1990). Cutaneous mycobacteriosis in a harbor seal: Attempted treatment with hyperbaric oxygen. *J Zoo Wildl Med*, 21(1): 73-78.

- West, K.L., Sánchez, S., Rotstein, D., Robertson, K.M., Dennison, S., Levine, G., Davis, N., Schofield, D., Potter, C.W., Jensen, B. (2013). A Longman's beaked whale (*Indopacetus pacificus*) strands in Maui, Hawaii, with first case of morbillivirus in the central Pacific. *Mar Mamm Sci*, 29(4): 767-776.
- West, K.L., Levine, G., Jacob, J., Jensen, B., Sanchez, S., Colegrove, K., Rotstein, D. (2015). Coinfection and vertical transmission of *Brucella* and Morbillivirus in a neonatal sperm whale (*Physeter macrocephalus*) in Hawaii, USA. *J Wildl Dis*, 51(1): 227-232.
- Whittow, G.C., Hampton, I.F.G., Matsuura, D.T., Ohata, C.A., Smith, R.M., Allen, J.F. (1974). Body temperature of three species of whales. *J Mamm*, 55(3): 653-656.
- Will, R.K., Ring, E.F.J., Clarke, A.K., Maddison, P.I. (1992). Infrared thermography, what is its place in rheumatology in the 1990's. *Br J Rheumatol*, 31(5): 337-344.
- Williams, S.T., Lanning, S., Wellington, E.M.H. (1983). Ecology of actinomycetes. En *The Biology of Actinomycetes*. (M. Goodfellow, M. Mordarski, S.T. Williams, Eds.), pp. 481-528. Academic Press, London.
- Wilson, T.M., Cheville, N.F., Karstad, L. (1969). Seal pox. Case history. *Bull Wildl Dis Assoc*, 5(4): 412-418.
- Wilson, T.M., Poglayen-Neuwall, I. (1971). Pox in South American sea lions (*Otaria byronia*). *Can J Comp Med*, 35(2): 174-177.
- Wilson, D.E., Reeder, D.M. (2005). *Mammal of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. Third edition*, pp. 2.142. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Wishart, G.C., Campisi, M., Boswell, M., Chapman, D., Shackleton, V., Iddles, S., Hallett, A., Britton, P.D. (2010). The accuracy of digital infrared imaging for breast cancer detection in women undergoing breast biopsy. *Eur J Surg Oncol*, 36(6): 535-540.
- Wohlsein, P., Puff, C., Kreutzer, M., Siebert, U., Baumgartner, W. (2007). Distemper in a dolphin. *Emerg Infect Dis*, 13(12): 1959-1961.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Lam, C.S., Tsang, A.K., Hui, S.W., Fan, R.Y., Martelli, P., Yuen, K.Y. (2014). Discovery of a novel bottlenose dolphin coronavirus reveals a distinct species of marine mammal coronavirus in Gammacoronavirus. *J Virol*, 88(2): 1318-1331.
- Wood, R.L., Shuman, R.D. (1981). *Erysipelothrix* infection. En *Infectious diseases of wild mammals. Second edition*. (J.L. Davis, L.H. Karstad, D.O. Trainer Eds.), pp. 297-305. Iowa State University Press, Ames.
- Wood, J.P., Choi, Y.W., Wendling, M.Q., Rogers, J.V., Chappie, D.J. (2013). Environmental persistence of vaccinia virus on materials. *Lett Appl Microbiol*, 57(5): 399-404.
- Wu, Q., Conway, J., Phillips, K.M., Stolen, M., Durden, W.N., Fauquier, D., McFee, W.E., Schwacke, L. (2016). Detection of *Brucella* spp. in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) by a real-time PCR using blowhole swabs. *Dis Aquat Org*, 120(3): 241-244.

- Wunderlich, C., Woodman, W. (1871). *On the temperature in diseases, a Manual of medical thermometry*. Vol. 71, pp. 493. The New Sydenham Society, London.
- Wünschmann, A., Armien, A., Harris, N.B., Brown-Elliott, B.A., Wallace, R.J.Jr., Rasmussen, J., Willette, M., Wolf, T. (2008). Disseminated panniculitis in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) due to *Mycobacterium chelonae* infection. *J Zoo Wildl Med*, 39(3): 412-420.
- Yang, W.C., Pang, V.F., Jeng, C.R., Chou, L.S., Chueh, L.L. (2006). Morbilliviral infection in a pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*) from Taiwanese waters. *Vet Microbiol*, 116(1-3): 69-76.
- Yang, H., Nguyen, H.T., Carney, P.J., Guo, Z., Chang, J.C., Jones, J., Davis, C.T., Villanueva, J.M., Gubareva, L.V., Stevens, J. (2015). Structural and functional analysis of surface proteins from an A(H3N8) influenza virus isolated from New England harbor seals. *J Virol*, 89(5): 2801-2812.
- Yang, W.C., Wu, B.J., Sierra, E., Fernandez, A., Groch, K.R., Catão-Dias, J.L., West, K., Chan, K.W. (2016). A simultaneous diagnosis and genotyping method for global surveillance of cetacean morbillivirus. *Sci Rep*, 6: 30625.
- Yanmaz, L.E., Okumus, Z., Dogan, E. (2007). Instrumentation of thermography and its application in horses. *J Anim Vet Adv*, 6(7): 858-862.
- Young, J.E., Huff, D.G., Ford, J.K.B., Anthony, J.M.G., Ellis, G., Lewis, R.L. (1997). First case report on mortality of wild resident killer whale (*Orcinus orca*) from *Erysipelothrix rhusopathiae*. En *Proc 28th Annu Conf Int Assoc Aquat Anim Med*. (G.A. Lewbart, Ed.), pp. 70-74. Harderwijk.
- Yu, J.H., Xia, Z.F. (2013). Bacterial infection in an Irrawaddy dolphin (*Orcaella brevirostris*). *J Zoo Wildl Med*, 44(1): 156-158.
- Zachary, J.F., McGavin, M.D. (2012). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Fifth edition, pp. 1.344. Mosby, St. Louis.
- Zarnke, R.L., Harder, T.C., Vos, H.W., Ver Hoef, J.M., Osterhaus, A.D. (1997). Serologic survey for phocid herpesvirus-1 and -2 in marine mammals from Alaska and Russia. *J Wildl Dis*, 33(3): 459-465.
- Zelichowska, B., Rozycki, R., Tlustochowicz, M., Kujawa, A., Kalicki, B., Murawski, P. (2005). The usefulness of the thermography in the dry eye syndrome. *Klin Oczna*, 107(7-9): 483-487.
- Zohari, S., Neimanis, A., Härkönen, T., Moraeus, C., Valarcher, J.F. (2014). Avian influenza A (H10N7) virus involvement in mass mortality of harbour seals (*Phoca vitulina*) in Sweden, March through October 2014. *Euro Surveill*, 19(46): 20967.



## 7. ANEXOS



Fuente de la imagen: [FreeImages.com/Eva Schuster](https://www.freemove.com/Eva-Schuster).

## ANEXO I. Sistemática de los mamíferos marinos.

Los taxones y especies se encuentran ordenados alfabéticamente. Cada especie aparece identificada con *Nombre científico* (Apellido del autor, año de la descripción). Nombre común en castellano. Nombre común en inglés. (Fuente de los datos: Carwardine y Camm, 2002; Wada *et al.*, 2003; Reeves *et al.*, 2005; Wilson y Reeder, 2005; Dalebout *et al.*, 2014; Roskov *et al.*, 2016).

### CLASE MAMMALIA (Linnaeus, 1758)

#### CETARTIODACTYLA (Montgelard, Catzeflis y Douzery, 1997)

#### ORDEN CETACEA (Brisson, 1762)

#### SUBORDEN MYSTICETI (Flower, 1864)

#### Familia Balaenidae (Gray, 1821)

##### *Balaena* (Linnaeus, 1758)

*B. mysticetus* (Linnaeus, 1758). Ballena de Groenlandia. Bowhead.

##### *Eubalaena* (Gray, 1864)

*E. australis* (Desmoulins, 1822). Ballena franca austral. Southern right whale.

*E. glacialis* (Müller, 1776). Ballena franca glacial. North Atlantic right whale.

*E. japonica* (Lacépède, 1818). Ballena franca del Pacífico norte. North Pacific right whale.

#### Familia Balaenopteridae (Gray, 1864)

##### *Balaenoptera* (Lacépède, 1804)

*B. acutorostrata* (Lacépède, 1804). Rorcual aliblanco. Common minke whale.

*B. a. acutorostrata* (Lacépède, 1804). Rorcual aliblanco del Atlántico norte. North Atlantic minke whale.

*B. a. scammoni* (Deméré, 1986). Rorcual aliblanco del Pacífico norte. Scammon's minke whale.

*B. a. subespecie sin nomenclatura* (Rice, 1998). Rorcual aliblanco enano. Dwarf minke whale.

*B. bonaerensis* (Burmeister, 1867). Rorcual aliblanco del Antártico. Antarctic minke whale.

*B. borealis* (Lesson, 1828). Rorcual norteno. Sei whale.

*B. b. borealis* (Lesson, 1828). Rorcual norteno del norte. Northern sei whale.

*B. b. schlegelii* (Flower, 1865). Rorcual norteno del sur. Southern sei whale.

*B. edeni* (Anderson, 1879). Rorcual tropical. Bryde's whale.

*B. musculus* (Linnaeus, 1758). Ballena azul. Blue whale.

*B. m. breviceauda* (Ichihara, 1966). Ballena azul pigmea. Pygmy blue whale.

*B. m. indica* (Blyth, 1859). Ballena azul del océano Índico del norte. Great Indian rorqual.

*B. m. intermedia* (Burmeister, 1871). Ballena azul del Antártico. Southern blue whale.

*B. m. musculus* (Linnaeus, 1758). Ballena azul del norte. Northern blue whale.

*B. omurai* (Wada, Oishi y Yamada, 2003). Ballena de Omura. Omura's whale.

*B. physalus* (Linnaeus, 1758). Rorcual común. Fin whale.

*B. p. physalus* (Linnaeus, 1758). Rorcual común del norte. Northern fin whale.

*B. p. quoyi* (Fischer, 1829). Rorcual común del sur. Southern fin whale.

*Megaptera* (Gray, 1846)

*M. novaeangliae* (Borowski, 1781). Ballena yubarta. Humpback whale.

**Familia *Eschrichtiidae*** (Ellerman and Morrison-Scott, 1951)

*Eschrichtius* (Gray, 1864)

*E. robustus* (Lilljeborg, 1860). Ballena gris. Gray whale.

**Familia *Neobalaenidae*** (Gray, 1873)

*Caperea* (Gray, 1864)

*C. marginata* (Gray, 1846). Ballena franca pigmea. Pygmy right whale.

**SUBORDEN *ODONTOCETI*** (Flower, 1867)

**Familia *Delphinidae*** (Gray, 1821)

*Cephalorhynchus* (Gray, 1846)

*C. commersonii* (Lacépède, 1804). Delfín de Commerson. Commerson's dolphin.

*C. c. commersonii* (Lacépède, 1804). Delfín de Commerson. Commerson's dolphin.

*C. c. kerguelensis* (Robineau, Goodall, Pichler y Baker, 2007). Delfín de Commerson de las islas Kerguelen. Kerguelen Island Commerson's dolphin.

*C. eutropia* (Gray, 1846). Delfín chileno. Chilean dolphin.

*C. heavisidii* (Gray, 1828). Delfín de Haviside. Haviside's dolphin.

*C. hectori* (van Beneden, 1881). Delfín de Héctor. Hector's dolphin.

*C. h. hectori* (van Beneden, 1881). Delfín de Héctor de la isla del sur. South Island Hector's dolphin.

*C. h. maui* (Baker, Smith y Pichler, 2002). Delfín de Maui. North Island Hector's dolphin.

*Delphinus* (Linnaeus, 1758)

*D. capensis* (Gray, 1828). Delfín común de hocico largo. Long-beaked common dolphin.

*D. c. capensis* (Gray, 1828). Delfín común de hocico largo. Long-beaked common dolphin.

*D. c. tropicalis* (van Bree, 1971). Delfín común Indo-Pacífico. Indo-Pacific common dolphin.

*D. delphis* (Linnaeus, 1758). Delfín común de hocico corto. Short-beaked common dolphin.

*D. d. delphis* (Linnaeus, 1758). Delfín común de hocico corto. Common saddle-backed dolphin.

*D. d. ponticus* (Barabash, 1935). Delfín común del mar Negro. Black Sea common dolphin.

*Feresa* (Gray, 1870)

*F. attenuata* (Gray, 1874). Orca pigmea. Pygmy killer whale.

*Globicephala* (Lesson, 1828)

*G. macrorhynchus* (Gray, 1846). Calderón tropical. Short-finned pilot whale.

*G. melas* (Traill, 1809). Calderón común. Long-finned pilot whale.

*G. m. edwardii* (Smith, 1834). Calderón común del sur. Southern longfinned pilot whale.

*G. m. melas* (Traill, 1809). Calderón común del Atlántico norte. North Atlantic longfinned pilot whale.

*Grampus* (Gray, 1828)

*G. griseus* (Cuvier, 1812). Calderón gris. Risso's dolphin.

*Lagenodelphis* (Fraser, 1956)

*L. hosei* (Fraser, 1956). Delfín de Fraser. Fraser's dolphin.

*Lagenorhynchus* (Gray, 1846)

*L. acutus* (Gray, 1828). Delfín de flancos blancos del Atlántico. Atlantic white-sided dolphin.

*L. albirostris* (Gray, 1846). Delfín de hocico blanco. White-beaked dolphin.



*L. australis* (Peale, 1848). Delfín de Peale. Peale's dolphin.

*L. cruciger* (Quoy y Gaimard, 1824). Delfín cruzado. Hourglass dolphin.

*L. obliquidens* (Gill, 1865). Delfín de flancos blancos del Pacífico. Pacific white-sided dolphin.

*L. obscurus* (Gray, 1828). Delfín de Dusky. Dusky dolphin.

*L. o. fitzroyi* (Waterhouse, 1838). Delfín de Fitzroy. South American Dusky dolphin.

*L. o. obscurus* (Gray, 1828). Delfín de Dusky africano. South African Dusky dolphin.

*Lissodelphis* (Gloger, 1841)

*L. borealis* (Peale, 1848). Delfín liso del norte. Northern right whale dolphin.

*L. peronii* (Lacépède, 1804). Delfín liso austral. Southern right whale dolphin.

*Orcaella* (Gray, 1866)

*O. brevirostris* (Owen en Gray, 1866). Delfín de Irrawaddy. Irrawaddy dolphin.

*O. heinsohni* (Beasley, Robertson y Arnold, 2005). Delfín australiano de aleta corta. Australian snubfin dolphin.

*Orcinus* (Fitzinger, 1860)

*O. orca* (Linnaeus, 1758). Orca. Killer whale.

*Peponocephala* (Nishiwaki y Norris, 1966)

*P. electra* (Gray, 1846). Delfín cabeza de melón. Melon-headed whale.

*Pseudorca* (Reinhardt, 1862)

*P. crassidens* (Owen, 1846). Falsa orca. False killer whale.

*Sotalia* (Gray, 1866)

*S. fluviatilis* (Gervais y Deville, 1853). Tucuxi. Tucuxi.

*S. guianensis* (Van Bénédén, 1864). Delfín costero. Guiana dolphin.

*Sousa* (Gray, 1866)

*S. chinensis* (Osbeck, 1765). Delfín jorobado del Pacífico. Indo-Pacific humpbacked dolphin.

*S. plumbea* (G. Cuvier, 1829). Delfín jorobado del Índico. Indian humpback dolphin.

*S. sahulensis* (Jefferson y Rosenbaum, 2014). Delfín jorobado australiano. Australian humpback dolphin.

*S. teuszii* (Kükenthal, 1892). Delfín jorobado del Atlántico. Atlantic humpbacked dolphin.

*Stenella* (Gray, 1866)

*S. attenuata* (Gray, 1846). Delfín moteado pantropical. Pantropical spotted dolphin.

*S. a. attenuata* (Gray, 1846). Delfín moteado pantropical oceánico. Pantropical spotted dolphin.

*S. a. graffmani* (Lönnerberg, 1934). Delfín moteado pantropical costero. Coastal spotted dolphin.

*S. clymene* (Gray, 1846). Delfín de Clymene. Clymene dolphin.

*S. coeruleoalba* (Meyen, 1833). Delfín listado. Striped dolphin.

*S. frontalis* (Cuvier, 1829). Delfín moteado del Atlántico. Atlantic spotted dolphin.

*S. longirostris* (Gray, 1828). Delfín acróbata. Spinner dolphin.

*S. l. centroamericana* (Perrin, 1990). Delfín acróbata de América central. Central american spinner dolphin.

*S. l. longirostris* (Gray, 1828). Delfín acróbata de Gray. Gray's spinner dolphin.

*S. l. orientalis* (Perrin, 1990). Delfín acróbata del este. Eastern spinner dolphin.

*Steno* (Gray, 1846)

*S. bredanensis* (Cuvier en Lesson, 1828). Delfín de dientes rugosos. Rough-toothed dolphin.

*Tursiops* (Gervais, 1855)

*T. aduncus* (Ehrenberg, 1833). Delfín mular Indo-Pacífico. Indo-Pacific bottlenose dolphin.

*T. truncatus* (Montagu, 1821). Delfín mular. Bottlenose dolphin.

*T. t. gillii* (Dall, 1873). Delfín mular del Pacífico. Gill's dolphin.

*T. t. ponticus* (Barabash-Nikiforov, 1940). Delfín mular del mar Negro. Black Sea bottlenose dolphin.

*T. t. truncatus* (Montagu, 1821). Delfín mular del Atlántico. Atlantic bottlenose dolphin.

Familia *Iniidae* (Gray, 1846)*Inia* (d'Orbigny, 1834)

*I. geoffrensis* (Blainville, 1817). Delfín del río Amazonas. Amazon River dolphin.

*I. g. boliviensis* (d'Orbigny, 1834). Bufo boliviano. Bolivian River dolphin.

*I. g. geoffrensis* (Blainville, 1817). Boto. Amazon River dolphin.

*I. g. humboldtiana* (Pilleri y Gihl, 1978). Bufo del Orinoco. Orinoco River dolphin.

**Familia Kogiidae** (Gill, 1871)

*Kogia* (Gray, 1846)

*K. breviceps* (Blainville, 1838). Cachalote pigmeo. Pygmy sperm whale.

*K. sima* (Owen, 1866). Cachalote enano. Dwarf sperm whale.

**Familia Lipotidae** (Zhou, Qian y Li, 1978)

*Lipotes* (Miller, 1918)

*L. vexillifer* (Miller, 1918). Delfín del río Yangtze. Baiji.

**Familia Monodontidae** (Gray, 1821)

*Delphinapterus* (Lacépède, 1804)

*D. leucas* (Pallas, 1776). Beluga. Beluga.

*Monodon* (Linnaeus, 1758)

*M. monoceros* (Linnaeus, 1758). Narval. Narwhal.

**Familia Phocoenidae** (Gray, 1825)

*Neophocaena* (Palmer, 1899)

*N. asiaeorientalis* (Pilleri y Gihl, 1972). Marsopa sin aleta de cresta angosta. Narrow-ridged finless porpoise.

*N. a. asiaeorientalis* (Pilleri and Gihl, 1972). Marsopa sin aleta del río Yangtze. Yangtse River porpoise.

*N. a. sunameri* (Pilleri y Gihl, 1975). Marsopa sin aleta del este asiático. Sunameri.

*N. phocaenoides* (Cuvier, 1829). Marsopa sin aleta del Indo-Pacífico. Finless porpoise.

*Phocoena* (Cuvier, 1816)

*P. dioptrica* (Lahille, 1912). Marsopa de anteojos. Spectacled porpoise.

*P. phocoena* (Linnaeus, 1758). Marsopa común. Harbor porpoise.

*P. p. phocoena* (Linnaeus, 1758). Marsopa común del Atlántico. North Atlantic harbor porpoise.

*P. p. relict*a (Abel, 1905). Marsopa común del mar Negro. Black Sea harbor porpoise.

*P. p. vomerina* (Gill, 1865). Marsopa común del Pacífico este. Eastern North Pacific harbor porpoise.

*P. sinus* (Norris y McFarland, 1958). Vaquita marina. Vaquita.

*P. spinipinnis* (Burmeister, 1865). Marsopa de Burmeister. Burmeister's porpoise.

*Phocoenoides* (Andrews, 1911)

*P. dalli* (True, 1885). Marsopa de Dall. Dall's porpoise.

*P. d. dalli* (True, 1885). Marsopa de Dall tipo Dalli. Dall's porpoise.

*P. d. truei* (Andrews, 1911). Marsopa de Dall tipo Truei. True's porpoise.

#### Familia *Physeteridae* (Gray, 1821)

*Physeter* (Linnaeus, 1758)

*P. macrocephalus* (Linnaeus, 1758). Cachalote. Sperm whale.

#### Familia *Platanistidae* (Gray, 1846)

*Platanista* (Wagler, 1830)

*P. gangetica* (Roxburgh, 1801). Delfín del río Ganges. Ganges River dolphin.

*P. minor* (Owen, 1853). Delfín del río Indo. Indus River dolphin.

#### Familia *Pontoporiidae* (Gray, 1870)

*Pontoporia* (Gray, 1846)

*P. blainvillei* (Gervais y d'Orbigny, 1844). Franciscana. Franciscana.

#### Familia *Ziphiidae* (Gray, 1865)

*Berardius* (Duvernoy, 1851)

*B. arnuxii* (Duvernoy, 1851). Zifio de Arnoux. Arnoux's beaked whale.

*B. bairdii* (Stejneger, 1883). Zifio de Baird. Baird's beaked whale.

*Hyperoodon* (Lacépède, 1804)

*H. ampullatus* (Forster, 1770). Zifio boreal del norte. Northern bottlenose whale.

*H. planifrons* (Flower, 1882). Zifio boreal del sur. Southern bottlenose whale.

*Indopacetus* (Moore, 1968)

*I. pacificus* (Longman, 1926). Zifio de Longman. Tropical bottlenose whale.

*Mesoplodon* (Gervais, 1850)

*M. bidens* (Sowerby, 1804). Zifio de Sowerby. Sowerby's beaked whale.

*M. bowdoini* (Andrews, 1908). Zifio de Andrews. Andrews' beaked whale.

*M. carlhubbsi* (Moore, 1963). Zifio de Hubbs. Hubbs' beaked whale.

*M. densirostris* (Blainville, 1817). Zifio de Blainville. Blainville's beaked whale.

*M. europaeus* (Gervais, 1855). Zifio de Gervais. Gervais' beaked whale.

*M. ginkgodens* (Nishiwaki y Kamiya, 1958). Zifio de Nishiwaki. Ginkgo-toothed beaked whale.

*M. grayi* (von Haast, 1876). Zifio de Gray. Gray's beaked whale.

*M. hectori* (Gray, 1871). Zifio de Héctor. Hector's beaked whale.

*M. hotaula* (Deraniyagala, 1963). Zifio de Deraniyagala. Deraniyagala's beaked whale.

*M. layardii* (Gray, 1865). Zifio de Layard. Strap-toothed beaked whale.

*M. mirus* (True, 1913). Zifio de True. True's beaked whale.

*M. perrini* (Dalebout, Mead, Baker, van Helden y Baker, 2002). Zifio de Perrin. Perrin's beaked whale.

*M. peruvianus* (Reyes, Mead, y Van Waerebeek, 1991). Zifio pigmeo. Pygmy beaked whale.

*M. stejnegeri* (True, 1885). Zifio de Stejneger. Stejneger's beaked whale.

*M. traversii* (Gray, 1874). Zifio de Travers. Spade-toothed whale.

*Tasmacetus* (Oliver, 1937)

*T. shepherdi* (Oliver, 1937). Zifio de Shepherd. Shepherd's beaked whale.

*Ziphius* (Cuvier, 1823)

*Z. cavirostris* (Cuvier, 1823). Zifio de Cuvier. Cuvier's beaked whale.

## **ORDEN CARNIVORA**

### **SUBORDEN CANIFORMIA**

#### **Familia *Mustelidae*\* (Fischer, 1817)**

*Enhydra* (Fleming, 1822)

*E. lutris* (Linnaeus, 1758). Nutria marina. Sea otter.

*E. l. kenyoni* (Wilson, 1991). Nutria marina del norte. Northern sea otter.

*E. l. lutris* (Linnaeus, 1758). Nutria marina de Alaska. Alaska sea otter.

*E. l. nereis* (Merriam, 1904). Nutria marina de California. Southern sea otter.

*Lontra* (Gray, 1843)

*L. felina* (Molina, 1782). Gato de mar. Marine otter.

#### **Familia *Odobenidae* (Allen, 1880)**

*Odobenus* (Brisson, 1762)

*O. rosmarus* (Linnaeus, 1758). Morsa. Walrus.

*O. r. divergens* (Illiger, 1815). Morsa del Pacífico. Pacific walrus.



*O. r. laptevi* (Chapskii, 1940). Morsa del mar Laptev. Laptev walrus.

*O. r. rosmarus* (Linnaeus, 1758). Morsa del Atlántico. Atlantic walrus.

### Familia *Otariidae* (Gray, 1825)

*Arctocephalus* (Geoffroy Saint-Hilaire y Cuvier, 1826.)

*A. australis* (Zimmermann, 1783). Oso marino sudamericano. South American fur seal.

*A. forsteri* (Lesson, 1828). Oso marino de Nueva Zelanda. Australasian fur seal.

*A. galapagoensis* (Heller, 1904). Oso marino de las islas Galápagos. Galapagos fur seal.

*A. gazella* (Peters, 1875). Oso marino antártico. Antarctic fur seal.

*A. philippii* (Peters, 1866). Oso marino de Juan Fernández. Juan Fernández fur seal.

*A. pusillus* (Schreber, 1775). Oso marino sudafricano y australiano. South African fur seal.

*A. p. doriferus* (Wood Jones, 1925). Oso marino australiano. Australian fur seal.

*A. p. pusillus* (Schreber, 1775). Oso marino sudafricano. Cape fur seal.

*A. townsendi* (Merriam, 1897). Oso marino de Guadalupe. Guadalupe fur seal.

*A. tropicalis* (Gray, 1872). Oso marino subantártico. Subantarctic fur seal.

*Callorhinus* (Gray, 1859.)

*C. ursinus* (Linnaeus, 1758). Oso marino del norte. Northern fur seal.

*Eumetopias* (Gill, 1866)

*E. jubatus* (Schreber, 1776). León marino de Steller. Steller sea lion.

*Neophoca* (Gray, 1866)

*N. cinerea* (Péron, 1816). León marino australiano. Australian sea lion.

*Otaria* (Péron, 1816)

*O. flavescens* (Shaw, 1800). León marino de la Patagonia. South American sea lion.

*Phocarcos* (Peters, 1866)

*P. hookeri* (Gray, 1844). León marino de Hooker. New Zealand sea lion.

*Zalophus* (Gill, 1866)

*Z. californianus* (Lesson, 1828). León marino de California. California sea lion.

*Z. japonicus* (Peters, 1866). León marino de Japón. Japanese sea lion.

*Z. wolfebaeki* (Sivertsen, 1953). León marino de las Galápagos. Galapagos sea lion.

**Familia *Phocidae*** (Gray, 1821)

*Cystophora* (Nilsson, 1820)

*C. cristata* (Erxleben, 1777). Foca capuchina. Hooded seal.

*Erignathus* (Gill, 1866)

*E. barbatus* (Erxleben, 1777). Foca barbuda. Bearded seal.

*E. b. barbatus* (Erxleben, 1777). Foca barbuda del Atlántico. Atlantic bearded seal.

*E. b. nauticus* (Pallas, 1811). Foca barbuda del Pacífico. Pacific bearded seal.

*Halichoerus* (Nilsson, 1820)

*H. grypus* (Fabricius, 1791). Foca gris. Gray seal.

*H. g. grypus* (Fabricius, 1791). Foca gris del Atlántico norte. Northwest Atlantic grey seal.

*H. g. macrorhynchus* (Hornschuch y Schilling, 1851). Foca gris del Báltico. Northeast Atlantic grey seal.

*Histiophoca* (Gill, 1873)

*H. fasciata* (Zimmermann, 1783). Foca listada. Ribbon seal.

*Hydrurga* (Gistel, 1848)

*H. leptonyx* (de Blainville, 1820). Foca leopardo. Leopard seal.

*Leptonychotes* (Gill, 1872)

*L. weddellii* (Lesson, 1826). Foca de Weddell. Weddell seal.

*Lobodon* (Gray, 1844)

*L. carcinophaga* (Hombron y Jacquinot, 1842). Foca cangrejera. Crabeater seal.

*Mirounga* (Gray, 1827)

*M. angustirostris* (Gill, 1866). Elefante marino del norte. Northern elephant seal.

*M. leonina* (Linnaeus, 1758). Elefante marino del sur. Southern elephant seal.

*Monachus* (Fleming, 1822)

*M. monachus* (Hermann, 1779). Foca monje del Mediterráneo. Mediterranean monk seal.

*M. schauinslandi* (Matschie, 1905). Foca monje de Hawái. Hawaiian monk seal.

*M. tropicalis* (Gray, 1850). Foca monje del Caribe. Caribbean monk seal.

*Ommatophoca* (Gray, 1844)

*O. rossii* (Gray, 1844). Foca de Ross. Ross seal.

*Pagophilus* (Gray, 1844)

*P. groenlandicus* (Erxleben, 1777). Foca de Groenlandia. Harp seal.

*Phoca* (Linnaeus, 1758)

*P. largha* (Pallas, 1811). Foca moteada. Spotted seal.

*P. vitulina* (Linnaeus, 1758). Foca común. Harbor seal.

*P. v. concolor* (De Kay, 1842). Foca común del Atlántico occidental. Western Atlantic harbor seal.

*P. v. mellonae* (Doutt, 1942). Foca Ungava. Ungava seal.

*P. v. richardii* (Gray, 1864). Foca común del Pacífico. Pacific harbor seal.

*P. v. stejnegeri* (Allen, 1902). Foca insular. Insular harbor seal.

*P. v. vitulina* (Linnaeus, 1758). Foca común del Atlántico oriental. Eastern Atlantic harbor seal.

*Pusa* (Scopoli, 1771)

*P. caspica* (Gmelin, 1788). Foca del Caspio. Caspian seal.

*P. hispida* (Schreber, 1775). Foca anillada. Ringed seal.

*P. h. botnica* (Gmelin, 1788). Foca anillada del Báltico. Baltic ringed seal.

*P. h. hispida* (Schreber, 1775). Foca anillada del Ártico. Arctic ringed seal.

*P. h. ladogensis* (Nordquist, 1899). Foca del Ladoga. Ladoga ringed seal.

*P. h. ochotensis* (Pallas, 1811). Foca anillada del mar Okhotsk. Okhotsk Sea ringed seal.

*P. h. saimensis* (Nordquist, 1899). Foca anillada del Saimaa. Saimaa ringed seal.

*P. sibirica* (Gmelin, 1788). Foca del Baikal. Baikal seal.

**Familia *Ursidae*\*** (Fischer de Waldheim, 1817)

*Ursus* (Linnaeus, 1758)

*U. maritimus* (Phipps, 1774). Oso polar. Polar bear.

## **ORDEN SIRENIA**

**Familia *Dugongidae*** (Gray, 1821)

*Dugong* (Lacépède, 1799)

*D. dugon* (Müller, 1776). Dugongo. Dugong.

*Hydrodamalis* (Retzius, 1794)

*H. gigas* (Zimmermann, 1780). Vaca marina de Steller. Steller's sea cow.

**Familia *Trichechidae*** (Gill, 1872)

*Trichechus* (Linnaeus, 1758)

*T. inunguis* (Natterer, 1883). Manatí del Amazonas. Amazonian manatee.

*T. manatus* (Linnaeus, 1758). Manatí común. West Indian manatee.

*T. m. latirostris* (Harlan, 1824). Manatí de Florida. Florida manatee.

*T. m. manatus* (Linnaeus, 1758). Manatí antillano. Antillan manatee.

*T. senegalensis* (Link, 1795). Manatí africano. African manatee.

\*De las familias *Mustelidae* y *Ursidae* sólo se incluyen las especies englobadas en el término mamíferos marinos.

## ANEXO II. Especies de mamíferos marinos clasificadas en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN en función de su riesgo relativo de extinción.

Cada especie aparece identificada con *nombre científico* (nombre común). En negrita aparecen destacadas las especies estudiadas en esta tesis doctoral. (Fuente de los datos: IUCN, 2016).

		CETÁCEOS	CARNÍVOROS	SIRÉNIDOS	TOTAL
EXTINTO	Extinto (EX)	0	2 <i>Neomonachus tropicalis</i> (Foca monje del Caribe) <i>Zalophus japonicus</i> (León marino de Japón)	1 <i>Hydrodamalis gigas</i> (Vaca marina de Steller)	3
	Extinto en estado silvestre (EW)	0	0	0	0
AMENAZADO	En peligro crítico (CR)	2 <i>Lipotes vexillifer</i> (Delfín del río Yangtze) <i>Phocoena sinus</i> (Vaquita marina)	0	0	2
	En peligro (EN)	7 <i>Balaenoptera borealis</i> (Rorcual norteño) <i>Balaenoptera musculus</i> (Ballena azul) <b><i>Balaenoptera physalus</i></b> (Rorcual común) <i>Cephalorhynchus hectori</i> (Delfín de Héctor) <i>Eubalaena glacialis</i> (Ballena franca glacial) <i>Eubalaena japonica</i> (Ballena franca del Pacífico norte) <i>Platanista gangetica</i> (Delfín del río Ganges)	9 <i>Arctocephalus galapagoensis</i> (Oso marino de las Galápagos) <i>Monachus monachus</i> (Foca monje del Mediterráneo) <i>Monachus schauinslandi</i> (Foca monje de Hawái) <i>Neophoca cinerea</i> (León marino australiano) <i>Phocartos hookeri</i> (León marino de Hooker) <i>Pusa caspica</i> (Foca del Caspio) <i>Zalophus wolfebaeki</i> (León marino de las Galápagos) <i>Enhydra lutris</i> (Nutria marina) <i>Lontra felina</i> (Gato de mar)	0	16
	Vulnerable (VU)	6 <i>Neophocaena asiaeorientalis</i> (Marsopa sin aleta de cresta angosta) <i>Neophocaena phocaenoides</i> (Marsopa sin aleta del Indo-Pacífico) <i>Orcaella brevirostris</i> (Delfín de Irrawaddy) <i>Physeter macrocephalus</i> (Cachalote) <i>Pontoporia blainvillei</i> (Franciscana) <i>Sousa teuszii</i> (Delfín jorobado del Atlántico)	3 <i>Callorhinus ursinus</i> (Oso marino del norte) <i>Cystophora cristata</i> (Foca capuchina) <i>Ursus maritimus</i> (Oso polar)	4 <i>Dugong dugon</i> (Dugongo) <i>Trichechus inunguis</i> (Manatí del Amazonas) <i>Trichechus manatus</i> (Manatí común) <i>Trichechus senegalensis</i> (Manatí africano)	13
	Casi amenazado (NT)	5 <i>Cephalorhynchus eutropia</i> (Delfín chileno) <b><i>Delphinapterus leucas</i></b> (Beluga) <i>Monodon monoceros</i> (Narval)	1 <i>Eumetopias jubatus</i> (León marino de Steller)	0	6



	<i>Orcaella heinsohni</i> (Delfin australiano de aleta corta) <i>Sousa chinensis</i> (Delfin jorobado del Pacífico)			
Preocupación menor (LC)	<b>22</b> <i>Balaena mysticetus</i> (Ballena de Groenlandia) <b><i>Balaenoptera acutorostrata</i></b> <b>(Rorcual aliblanco)</b> <i>Delphinus delphis</i> (Delfin común de hocico corto) <i>Eschrichtius robustus</i> (Ballena gris) <i>Eubalaena australis</i> (Ballena franca austral) <b><i>Grampus griseus</i></b> <b>(Calderón gris)</b> <i>Hyperoodon planifrons</i> (Zifio boreal del sur) <i>Lagenodelphis hosei</i> (Delfin de Fraser) <i>Lagenorhynchus acutus</i> (Delfin de flancos blancos del Atlántico) <i>Lagenorhynchus albirostris</i> (Delfin de hocico blanco) <i>Lagenorhynchus cruciger</i> (Delfin cruzado) <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> (Delfin de flancos blancos del Pacífico) <i>Lissodelphis borealis</i> (Delfin liso del norte) <i>Megaptera novaeangliae</i> (Ballena yubarta) <i>Peponocephala electra</i> (Delfin cabeza de melón) <i>Phocoena phocoena</i> (Marsopa común) <i>Phocoenoides dalli</i> (Marsopa de Dall) <i>Stenella attenuata</i> (Delfin moteado pantropical) <b><i>Stenella coeruleoalba</i></b> <b>(Delfin listado)</b> <i>Steno bredanensis</i> (Delfin de dientes rugosos) <b><i>Tursiops truncatus</i></b> <b>(Delfin mular)</b> <b><i>Ziphius cavirostris</i></b> <b>(Zifio de Cuvier)</b>	<b>21</b> <i>Arctocephalus australis</i> (Oso marino sudamericano) <i>Arctocephalus forsteri</i> (Oso marino de Nueva Zelanda) <i>Arctocephalus gazella</i> (Oso marino antártico) <i>Arctocephalus philippii</i> (Oso marino de Juan Fernández) <i>Arctocephalus pusillus</i> (Oso marino sudafricano y australiano) <i>Arctocephalus townsendi</i> (Oso marino de Guadalupe) <i>Arctocephalus tropicalis</i> (Oso marino subantártico) <i>Erignathus barbatus</i> (Foca barbuda) <i>Halichoerus grypus</i> (Foca gris) <i>Hydrurga leptonyx</i> (Foca leopardo) <i>Leptonychotes weddellii</i> (Foca de Weddell) <i>Lobodon carcinophaga</i> (Foca cangrejera) <i>Mirounga angustirostris</i> (Elefante marino del norte) <i>Mirounga leonina</i> (Elefante marino del sur) <i>Ommatophoca rossii</i> (Foca de Ross) <b><i>Otaria flavescens</i></b> <b>(León marino de la Patagonia)</b> <i>Pagophilus groenlandicus</i> (Foca de Groenlandia) <b><i>Phoca vitulina</i></b> <b>(Foca común)</b> <i>Pusa hispida</i> (Foca anillada) <i>Pusa sibirica</i> (Foca del Baikal) <i>Zalophus californianus</i> (León marino de California)	0	43
Datos insuficientes (DD)	<b>45</b> <i>Balaenoptera bonaerensis</i> (Rorcual aliblanco del Antártico) <i>Balaenoptera edeni</i> (Rorcual tropical) <i>Balaenoptera omurai</i> (Ballena de Omura) <i>Berardius arnuxii</i> (Zifio de Arnoux) <i>Berardius bairdii</i> (Zifio de Baird) <i>Caperea marginata</i> (Ballena franca pigmea)	<b>3</b> <i>Histriophoca fasciata</i> (Foca listada) <b><i>Odobenus rosmarus</i></b> <b>(Morsa)</b> <i>Phoca largha</i> (Foca moteada)	0	48

	<p><i>Cephalorhynchus commersonii</i> (Delfín de Commerson)</p> <p><i>Cephalorhynchus heavisidii</i> (Delfín de Haviside)</p> <p><i>Delphinus capensis</i> (Delfín común de hocico largo)</p> <p><i>Feresa attenuata</i> (Orca pigmea)</p> <p><i>Globicephala macrorhynchus</i> (Calderón tropical)</p> <p><i>Globicephala melas</i> (Calderón común)</p> <p><i>Hyperoodon ampullatus</i> (Zifio boreal del norte)</p> <p><i>Indopacetus pacificus</i> (Zifio de Longman)</p> <p><i>Inia geoffrensis</i> (Delfín del río Amazonas)</p> <p><i>Kogia breviceps</i> (Cachalote pigmeo)</p> <p><i>Kogia sima</i> (Cachalote enano)</p> <p><i>Lagenorhynchus australis</i> (Delfín de Peale)</p> <p><i>Lagenorhynchus obscurus</i> (Delfín de Dusky)</p> <p><i>Lissodelphis peronii</i> (Delfín liso austral)</p> <p><i>Mesoplodon bidens</i> (Zifio de Sowerby)</p> <p><i>Mesoplodon bowdoini</i> (Zifio de Andrews)</p> <p><i>Mesoplodon carlhubbsi</i> (Zifio de Hubbs)</p> <p><i>Mesoplodon densirostris</i> (Zifio de Blainville)</p> <p><i>Mesoplodon europaeus</i> (Zifio de Gervais)</p> <p><i>Mesoplodon ginkgodens</i> (Zifio de Nishiwaki)</p> <p><i>Mesoplodon grayi</i> (Zifio de Gray)</p> <p><i>Mesoplodon hectori</i> (Zifio de Héctor)</p> <p><i>tasmaniac layardii</i> (Zifio de Layard)</p> <p><i>Mesoplodon mirus</i> (Zifio de True)</p> <p><i>Mesoplodon perrini</i> (Zifio de Perrin)</p> <p><i>Mesoplodon peruvianus</i> (Zifio pigmeo)</p> <p><i>Mesoplodon stejnegeri</i> (Zifio de Stejneger)</p> <p><i>Mesoplodon traversii</i> (Zifio de Travers)</p> <p><i>Orcinus orca</i> (Orca)</p> <p><i>Phocoena dioptrica</i> (Marsopa de anteojos)</p> <p><i>Phocoena spinipinnis</i> (Marsopa de Burmeister)</p> <p><i>Pseudorca crassidens</i></p>			
--	--	--	--	--

	(Falsa orca) <i>Sotalia fluviatilis</i> (Tucuxi) <i>Sotalia guianensis</i> (Delfín costero) <i>Stenella clymene</i> (Delfín de Clymene) <i>Stenella frontalis</i> (Delfín moteado del Atlántico) <i>Stenella longirostris</i> (Delfín acróbata) <i>Tasmacetus shepherdii</i> (Zifio de Shepherd) <i>Tursiops aduncus</i> (Delfín mular Indo-Pacífico)			
TOTAL EVALUADO	87	39	5	131

### ANEXO III. Otras aportaciones científicas realizadas durante esta tesis doctoral.

#### Publicaciones científicas indexadas:

- Melero, M., González, F., Nicolás, O., López, I., Jiménez, M.A., Jato-Sánchez, S., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013). Detection and assessment of electrocution in endangered raptors by infrared thermography. *BMC Veterinary Research*, 9, 149.
- Jiménez Martínez, M.A., Rubio-Guerri, C., Melero, M., Crespo, J.L., García, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015). Histopathological findings in cetaceans stranded on the Spanish Mediterranean coast between 2011 and 2014. *Journal of Comparative Pathology*, 152(1), 89.
- Crespo, J.L., García-Párraga, D., Giménez, I., Rubio-Guerri, C., Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Marco, A., Cuesta, J.A., Muñoz, M.J. (2013). Two cases of pseudohermaphroditism in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 183-191.
- Rodríguez-Prieto, V., Vicente-Rubiano, M., Sánchez-Matamoros, A., Rubio-Guerri, C., Melero, M., Martínez-López, B., Martínez-Avilés, M., Hoinville, L., Vergne, T., Comin, A., Schauer, B., Dorea, F., Pfeiffer, D.U., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015). Systematic review of surveillance systems and methods for early detection of exotic, new and re-emerging diseases in animal populations. *Epidemiology and Infection*, 143, 2018-2042.

#### Congresos internacionales (posters):

- 33rd Annual Meeting of The European Society of Veterinary Pathology and 26th Annual Meeting of The European College of Veterinary Pathologists. Helsinki, Finlandia. 2015:
  - ♦ Jiménez, M.A., Crespo, J.L., García, D., Melero, M., Rubio-Guerri, C., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Complex polysaccharide storage cardiomyopathy in a stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*).
  - ♦ Marcos, L., Valderrábano, E., Rois, J., Melero, M., Jiménez, M.A. Disease prevalence and cause of death in a captive population of wallabies (*Macropus rufogriseus*).

- *Annual Conference of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine (SVEPM)*. Dublín, Irlanda. 2014:
  - ♦ Vicente-Rubiano, M., Rodríguez-Prieto, V., Martínez, M., Sánchez-Matamoros, A., Rubio-Guerri, C., Melero, M., Martínez-López, B., Hoinville, L., Vergne, T., Comin, A., Schauer, B., Dórea, F., Pfeiffer, D., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Literature review of surveillance systems and approaches for the early detection of new, exotic and re-emerging diseases.
- *40th Symposium of the European Association for Aquatic Mammals (EAAM)*. Madrid, Spain. 2012:
  - ♦ Crespo, J.L., Melero, M., Rubio-Guerri, C., Sánchez-Vizcaíno, J.M., García-Párraga, D. Use of radiographic parameters for age estimation in stranded cetaceans.

#### Congreso nacional (comunicación oral):

- *VIII Congreso de la Sociedad Española de Cetáceos*. Vigo. 2015:
  - ♦ Crespo-Picazo, J.L., Jiménez, M.A., Rubio-Guerri, C., Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M., García-Párraga, D. Interacción inter-específica con resultado de muerte en varias especies de delfines en aguas de la Comunidad Valenciana. Cinco casos.

#### Tutorización de alumnos en congresos nacionales (comunicaciones orales):

- *XI Jornadas Complutenses, X Congreso Nacional Investigación Alumnos Pregraduados en Ciencias de la Salud y XV Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas*. Madrid. 2016:
  - ♦ Vargas, I., Melero, M., Martínez Nevado, E., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía en la detección, clasificación y seguimiento de lesiones de piel en mamíferos marinos.
- *X Jornadas Complutenses, IX Congreso Nacional de Investigación en Ciencias de la Salud para Alumnos Pregraduados y XIV Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas*. Madrid. 2015:



- ♦ Pickford, A., Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Estudio de poxvirus en mamíferos marinos.
- ♦ Vargas, I., Melero, M., Navarro, I., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía en la valoración de las consecuencias derivadas de la amputación de un miembro torácico en aves rapaces.
- ♦ Del Pozo, A., Melero, M., Martínez Nevado, E., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Estudio termográfico de tres casos clínicos en koalas (*Phascolarctos cinereus*).
- ♦ Sánchez, R., Ruiz, A.C., Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía en el diagnóstico de gestación de oso panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*).
- ♦ Serna, C., Santamaría, A., Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía al diagnóstico de gestación de tapir amazónico (*Tapirus terrestris*).
- ♦ García-Millán, I., Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Termografía aplicada al diagnóstico de gestación en jirafas.
- IX Jornadas Complutense, VIII Congreso Nacional de Investigación para Alumnos de Pregrado en Ciencias de la Salud y XIII Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas. Madrid. 2014:
  - ♦ Cárdenas, M.L., Benito, M.C., Melero, M., Rubio-Guerri, C., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Ilustración científica: los ojos que nos acercan al mar.
  - ♦ Ruiz, A.C., Sánchez, R., Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía al estudio de la termorregulación de hipopótamos.
  - ♦ Sánchez, R., Ruiz, A.C., Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía en el diagnóstico de gestación de rinoceronte blanco.
  - ♦ Serna, C., Santamaría, A., Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Aplicación de la termografía para la valoración de casos clínicos en mamíferos marinos.
  - ♦ Falcó, L., Melero, M., Delclaux, M., Alcántara, G., Sánchez-Vizcaíno, J.M. Estudio de la termorregulación en lémures mediante termografía.

- ♦ Rincón, J., Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Establecimiento del patrón termográfico del lobo ártico y del bisonte europeo y americano.**
- ♦ Rivas, S., Melero, M., López, I., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Termografía en rapaces.**
- ♦ Rodríguez, D., Trobiani, C., Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Aplicación de la termografía en la detección y evaluación de casos clínicos.**
- *VIII Jornadas Complutense, VII Congreso Nacional de Investigación para Alumnos de Pregrado en Ciencias de la Salud y XII Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.* Madrid. 2013:
  - ♦ Rodríguez, D., Melero, M., Trobiani, C., Sánchez, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Elaboración de un espacio web dedicado a la termografía.**
  - ♦ Pimenta, C.M, Melero, M., González, F., Teles Da Silva, C.I., Madeira de Carvalho, L.M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Termografía ocular: una alternativa a la temperatura cloacal en cernícalo primilla.**
  - ♦ Moro, J., Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Termografía en felinos y diagnóstico clínico.**
  - ♦ Sánchez, R., Ruiz, A.C., Melero, M., Alcántara, G., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Aplicación de la termografía al estudio de cerdos hormigueros.**
  - ♦ Ruiz, A.C., Sánchez, R., Melero, M., Pérez de Quadros, L., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Aplicación de la termografía al estudio de los pingüinos.**
  - ♦ Rodríguez, D., Trobiani, C., Melero, M., Sánchez, A., Forés, P., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Estudio de la temperatura corporal en caballos mediante termografía.**
  - ♦ Betancor, A., Rubio-Guerri, C., Melero, M., Crespo, J.L., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Estudio macroscópico comparado de la necropsia del delfín en tres casos clínicos.**
- *VII Jornadas Complutense, VI Congreso Nacional de Investigación para Alumnos de Pregrado en Ciencias de la Salud y XI Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.* Madrid. 2012:

- ♦ Broch, H., Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Aplicación de la termografía al estudio de la fauna europea.**
- ♦ Aguilar, L., García-Millán, I., Melero, M., Rodríguez-Prieto, V., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Aplicación de la termografía infrarroja al estudio de la termorregulación en lémures de cola anillada y casuarios.**
- ♦ García-Millán, I., Aguilar, L., Rodríguez-Prieto, V., Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. **Termografía aplicada al diagnóstico de gestación en jirafas.**



## CASE REPORT

## Open Access

# Detection and assessment of electrocution in endangered raptors by infrared thermography

Mar Melero<sup>1\*</sup>, Fernando González<sup>2</sup>, Olga Nicolás<sup>3</sup>, Irene López<sup>2</sup>, María de los Ángeles Jiménez<sup>4</sup>, Susana Jato-Sánchez<sup>2</sup> and José Manuel Sánchez-Vizcaíno<sup>1</sup>

### Abstract

**Background:** Most European birds of prey find themselves in a poor state of conservation, with electrocution as one of the most frequent causes of unnatural death. Since early detection of electrocution is difficult, treatment is usually implemented late, which reduces its effectiveness. By considering that electrocution reduces tissue temperature, it may be detectable by thermography, which would allow a more rapid identification. Three individuals from three endangered raptor species [Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*), Lammergeier (*Gypaetus barbatus*) and Osprey (*Pandion haliaetus*)] were studied thermographically from the time they were admitted to a rehabilitation centre to the time their clinical cases were resolved.

**Cases presentation:** The three raptors presented lesions lacking thermal bilateral symmetry and were consistent with electrocution of feet, wings and eyes, visible by thermography before than clinically; lesions were well-defined and showed a lower temperature than the surrounding tissue. Some lesions evolved thermally and clinically until the appearance of normal tissue recovered, while others evolved and became necrotic. A histopathological analysis of a damaged finger amputated off a Lammergeier, and the necropsy and histopathology examination of an osprey, confirmed the electrocution diagnosis.

**Conclusions:** These results suggest that thermography is effective and useful for the objective and early detection and monitoring of electrocuted birds, and that it may prove especially useful for examining live animals that require no amputation or cannot be subjected to invasive histopathology.

**Keywords:** Thermography, Electrocution, Raptor, Bird of prey, Spanish imperial eagle, Lammergeier, Osprey

### Background

Birds of prey have been proposed as good sentinels of environmental changes as they are placed at the top of the food chain and are widespread worldwide [1]. However, 36 (64%) of the 56 species of raptors inhabiting Europe find themselves in an unfavourable state of conservation [2]. Most raptor deaths are caused by direct and indirect actions of humans [1]. One of the most common causes of unnatural death is electrocution as a result of collisions with power lines and the subsequent trauma when the animal falls to the ground [1,3,4]. While unnatural mortality can be compensated in a healthy population, it can seriously affect a small population [5]. For example, electrocution poses a significant

survival problem for one of the most endangered raptors in the world, the Spanish imperial eagle [6].

The accuracy of electrocution mortality estimates is limited given the difficulty in determining cause of death [7]. Since determination of electrocution is usually based on anamnesis and clinical signs, i.e., electrical burns [1], detecting and evaluating an electrocuted bird can prove most difficult since anamnesis is often incomplete, and evidence for electrical trauma may not be immediately detectable [8]. Moreover, an early diagnosis of electrocution is essential for a good prognosis. For these reasons, complementary diagnostic tools, such as histopathology, are used when an amputation or necropsy is required [1,9]. Nevertheless, histopathology is invasive and may not be feasible or advisable for live animals, especially those that do not require amputation.

Thermography is a non-invasive technique used to assess tissue temperature that can be applied to electrocution

\* Correspondence: [mar.melero@sanidadanimal.info](mailto:mar.melero@sanidadanimal.info)

<sup>1</sup>VISAVET Centre and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain  
 Full list of author information is available at the end of the article





## CASE REPORT

## Open Access

# Unusual striped dolphin mass mortality episode related to cetacean morbillivirus in the Spanish Mediterranean sea

Consuelo Rubio-Guerri<sup>1\*†</sup>, Mar Melero<sup>1†</sup>, Fernando Esperón<sup>2</sup>, Edwige Nina Bellière<sup>2</sup>, Manuel Arbelo<sup>3</sup>, Jose Luis Crespo<sup>4</sup>, Eva Sierra<sup>3</sup>, Daniel García-Párraga<sup>4</sup> and Jose Manuel Sánchez-Vizcaíno<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** In the last 20 years, Cetacean Morbillivirus (CeMV) has been responsible for many die-offs in marine mammals worldwide, as clearly exemplified by the two dolphin morbillivirus (DMV) epizootics of 1990–1992 and 2006–2008, which affected Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). Between March and April 2011, the number of strandings on the Valencian Community coast (E Spain) increased.

**Case presentation:** Necropsy and sample collection were performed in all stranded animals, with good state of conservation. Subsequently, histopathology, immunohistochemistry, conventional reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Universal Probe Library (UPL) RT-PCR assays were performed to identify Morbillivirus. Gross and microscopic findings compatible with CeMV were found in the majority of analyzed animals. Immunopositivity in the brain and UPL RT-PCR positivity in seven of the nine analyzed animals in at least two tissues confirmed CeMV systemic infection. Phylogenetic analysis, based on sequencing part of the phosphoprotein gene, showed that this isolate is a closely related dolphin morbillivirus (DMV) to that responsible for the 2006–2008 epizootics.

**Conclusion:** The combination of gross and histopathologic findings compatible with DMV with immunopositivity and molecular detection of DMV suggests that this DMV strain could cause this die-off event.

**Keywords:** Cetacean morbillivirus, Dolphin morbillivirus, Mediterranean sea, Mass mortality, Striped dolphin

## Background

Over the last 20 years, epizootics caused by *Cetacean morbillivirus* (CeMV) (genus *Morbillivirus*, family *Paramyxoviridae*) have occurred among cetacean populations worldwide and have caused mass mortality [1]. Three main CeMV groups have been described: dolphin morbillivirus (DMV) [2], porpoise morbillivirus (PMV) [3] and pilot whale morbillivirus (PWMV) [4,5].

The spread of DMV infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean Sea caused around 1000 deaths in 1990–1992 [6]. This outbreak started in 1990 in the Gulf of Valencia, in the Spanish

Mediterranean Sea [7], and propagated along European Mediterranean coasts over the following months [2,8]. Then in 2007, a new DMV outbreak occurred off the Spanish Mediterranean coast. It affected approximately 100 striped dolphins [9] and up to 60 long-finned pilot whales (*Globicephala melas*) [10], and subsequently spread to the French Mediterranean coast [11].

In the last two decades, the annual mean mortality rate of dolphins stranded off the Mediterranean coast of Valencia has been 28.4 animals per year. However this rate lowers to 18.3 animals per year if the 1990 and 2007 outbreak years are excluded [12].

In the present study, 37 dolphins are reported as stranded dolphins in 2 months, which represents more than the annual mean in that region. An evaluation of *Morbillivirus* infection revealed the overwhelming positivity of the stranded animals, suggesting that DMV could

\* Correspondence: consuelo@sanidadanimal.info

†Equal contributors

<sup>1</sup>VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Av Puerta del Hierro s/n, Madrid 28040, Spain

Full list of author information is available at the end of the article







Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## Simultaneous diagnosis of Cetacean morbillivirus infection in dolphins stranded in the Spanish Mediterranean sea in 2011 using a novel Universal Probe Library (UPL) RT-PCR assay

Consuelo Rubio-Guerri<sup>a,\*</sup>, Mar Melero<sup>a</sup>, Belén Rivera-Arroyo<sup>a</sup>, Edwige Nina Bellière<sup>b</sup>, Jose Luis Crespo<sup>a,c</sup>, Daniel García-Párraga<sup>c</sup>, Fernando Esperón<sup>b</sup>, Jose Manuel Sánchez-Vizcaíno<sup>a</sup>

<sup>a</sup> VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, Ctra. de Algete a El Casar s/n, 28130 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Veterinary Services, Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias, C/Junta de Murs i Valls s/n, 46023 Valencia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 31 October 2012

Received in revised form 21 December 2012

Accepted 22 December 2012

## Keywords:

Cetaceans

Pilot whale morbillivirus (PWMV)

Porpoise morbillivirus (PMV)

Dolphin morbillivirus (DMV)

Universal Probe Library

Fusion protein gene

## ABSTRACT

A highly sensitive and specific real-time (rt) RT-PCR assay has been developed for rapid, simultaneous detection of three strains of cetacean morbillivirus (CeMV). In this assay, two PCR primers and a hydrolysis probe from a commercially available Universal Probe Library (UPL) are used to amplify a highly conserved region within the fusion protein gene. RT-PCR is carried out on the same sample using two primer sets in parallel: one set detects the more virulent strains, dolphin morbillivirus (DMV) and porpoise morbillivirus (PMV), and the other set detects the least virulent and least common strain, pilot whale morbillivirus (PWMV). Sensitivity analysis using dilute samples containing purified DMV, PMV and PWMV showed that viral RNA detection limits in this UPL RT-PCR assay were lower than in a conventional RT-PCR assay. Our method gave no amplification signal with field samples positive for viruses related and unrelated to CeMV, such as phocine distemper virus (PDV). The reliability and robustness of the UPL RT-PCR assay were verified using tissue samples previously analyzed by conventional methods, as well as a panel of clinical samples suspected of containing CeMV. Using the UPL RT-PCR assay, we were able to associate DMV with a mass stranding of striped dolphins in the Spanish Mediterranean in 2011 with greater reliability than was possible with a conventional RT-PCR method. These results suggest that this UPL RT-PCR method is more sensitive and specific than the conventional approach, and that it may be an affordable and rapid test for routine diagnosis of three CeMV strains.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cetacean morbillivirus (CeMV) is an enveloped, negative-strand RNA virus of the genus *Morbillivirus* (family Paramyxoviridae) (Kennedy, 1998). Over the last 25 years, CeMV has caused outbreaks of serious diseases affecting

the upper respiratory tract and central nervous system (CNS) in marine mammals, ultimately leading to numerous strandings and deaths. The first such epizootic was reported in 1987–88 off the Atlantic coast of the USA (Lipscomb et al., 1994), in which the virus killed an estimated 50% of the population of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). Subsequent epizootics in the Mediterranean and the Gulf of Mexico killed, respectively, approximately 1000 striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) (Aguilar and Raga, 1993) and 100 Atlantic bottlenose dolphins (Krafft et al., 1995; Lipscomb et al.,

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943702; fax: +34 913943908.  
E-mail addresses: [consuelo@sanidadanimal.info](mailto:consuelo@sanidadanimal.info), [crubioguerri@gmail.com](mailto:crubioguerri@gmail.com) (C. Rubio-Guerri).







MARINE MAMMAL SCIENCE, 29(1): 167–176 (January 2013)  
 © 2011 by the Society for Marine Mammalogy  
 DOI: 10.1111/j.1748-7692.2011.00533.x

## Identification of the pattern of appearance and development of thermal windows in the skin of juvenile Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*) in a controlled environment

VÍCTOR RODRÍGUEZ-PRIETO

ANA RUBIO-GARCÍA

MAR MELERO

VISAVET, Veterinary School,  
 Complutense University of Madrid,  
 Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain  
 E-mail: victor@sanidadanimal.info

DANIEL GARCÍA

Department of Veterinary Medicine,  
 L'Oceanogràfic,  
 Junta de Murs i Valls s/n, 46013 Valencia, Spain

JOSÉ MANUEL SÁNCHEZ-VIZCAÍNO

VISAVET, Veterinary School,  
 Complutense University of Madrid,  
 Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

Marine mammals maintain thermal equilibrium not only by relying on a layer of insulation (*e.g.*, fur or blubber) and a body shape with a relatively low surface-to-volume ratio, but also by adjusting blood flow to the skin and appendages (Bryden and Molyneux 1978, Molyneux and Bryden 1978, Hokkanen 1990, Dehnhardt *et al.* 1998, Boyd 2000). These areas of adjustable blood flow, known as thermal windows, act as heat-dissipaters or heat-conservers depending on the needs of the animal (Tattersall *et al.* 2009). For example, cetaceans have circulatory plexuses to enable counter-current heat transfer in the dorsal fin, the pectoral flippers and the flukes (Scholander and Schevill 1955). Among otariids, fur seals appear to use their flippers for removing heat excess while swimming (Bryden and Molyneux 1978), whereas Willis *et al.* (2005) demonstrated higher heat flux values around the hips and shoulders than in flippers of swimming and stationary Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). Phocids, in contrast, appear to use the extremities and the trunk for heat dissipation (Molyneux and Bryden 1978). In these species these areas of increased heat exchange are most often the result of arteriovenous anastomoses (AVAs), which control the passage of blood to the surface of the body to cool it (Krumbiegel 1933, Øritsland 1968, Bryden and Molyneux 1978, Molyneux and Bryden 1978, Mauck *et al.* 2003). While a great deal of research on thermal windows has been done in these two families of pinnipeds, no research has been published on the third family, the *Odobenidae* (walrus). The aim of this study was to identify whether the pattern in





**Conclusions:** A PVM was strongly suggested as a causative agent of encephalitis in this hedgehog with suspected WHS. This is a first report of PVM infection in hedgehogs.

#### HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS IN CETACEANS STRANDED ON THE SPANISH MEDITERRANEAN COAST BETWEEN 2011 AND 2014

M.A. Jiménez Martínez\*, C. Rubio-Guerri†, M. Melero‡, J.L. Crespo†, D. García† and J.M. Sánchez-Vizcaino†

\*Department of Animal Medicine and Surgery, †VISAVET Center, Department of Animal Health, Complutense University of Madrid and ‡Oceanografía de Valencia, Spain

**Introduction:** A histopathological study was carried out on 11 cetaceans stranded on the southeastern Spanish Mediterranean coast between 2011 and 2014. The purpose of this study was to contribute to the surveillance of the health status of the free-ranging cetacean population.

**Materials and Methods:** Formalin-fixed tissue samples were submitted for examination to the Pathology Service of the Complutense University Veterinary Hospital from eight striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), two Risso's dolphins (*Grampus griseus*) and one Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*).

**Results:** Mortality was due to trauma in 46% of the animals, infectious disease in 36% and was of unknown cause in 18% of the cases. The most frequent findings were chronic interstitial nephritis (55%), granulomatous pneumonia with intralesional metastrongyles (54%), lymphoid depletion (45%), meningoencephalitis (27%), chronic active hepatitis (18%) and granulomatous colitis with intralesional cestodes (18%). Incidental findings were an adrenal vascular hamartoma, a granulomatous lymphadenitis and orchitis. Viral pneumonia and/or meningoencephalitis consistent with dolphin morbillivirus (DMV) infection were noted in one of the striped dolphins. Two striped dolphins had mild chronic encephalitis suggestive of a prior or subclinical viral infection.

**Conclusions:** Infectious disease of some sort was found in all of the animals and not necessarily related to cause of death. Mortality was mainly due to trauma, followed by infectious disease (e.g. septicemia, viral infection). Generalized lymphoid depletion, suggestive of immune compromise, may favour certain infections. Similar studies in other parts of the Mediterranean have hypothesized an association between lymphoid depletion and environmental contaminants. Other possible causes remain to be elucidated.

#### FOOT LESIONS IN FARMED MINK (*NEOVISON VISON*)

A. Jespersen\*, A.S. Hammer\*, H.E. Jensen\*, N. Bonde-Jensen\*, M.M. Lassus\* and J.F. Agger†

\*Department of Veterinary Disease Biology and †Department of Production Animals and Horses, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Denmark

**Introduction:** The occurrence of calluses on the feet of mink has been mentioned only briefly in the literature; however, examination of feet from Danish farmed mink has revealed a large proportion of callus-like lesions in the plantar metatarsal area. The aim of this study was to evaluate the pathological, histopathological and epidemiological features of foot lesions in farmed mink.

**Materials and Methods:** The study included 1,163 mink from four Danish mink farms. The selection of farms was based on history of

foot lesions on all four farms. All feet including the carpus and tarsus were examined and lesions described macroscopically. For histological characterization, 22 tissue samples from a representative spectrum of feet with and without lesions were examined. Gross and microscopical appearance was compared with that of 47 free-ranging Danish mink.

**Results:** Feet were grouped according to gross inspection as: no lesions (55.1%), hair loss (7.1%), hyperkeratosis (35.8%) or crusting (5.3%). Lesions were predominantly located on the plantar surface of the metatarsal area (98.1%). Histologically, lesions included variable degrees of orthokeratotic hyperkeratosis and granulomatous to pyogranulomatous dermal inflammation with trichogranulomas as a dominating feature in all farmed and several free-ranging mink.

**Conclusions:** The gross and microscopical lesions resemble physically-induced changes as described in other species, which develop as a response to repeated friction or pressure to the plantar and palmar skin area.

#### GENERALIZED GRANULOMATOUS DISEASE IN A HUMBOLDT PENGUIN (*SPHENISCUS HUMBOLDTI*)

I.A. Paraschiv, E. Condruț, E. Ciobotaru, L. Tudor and M. Militaru

Faculty of Veterinary Medicine, University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine Bucharest, Romania

**Introduction:** Penguins are avian species with special husbandry needs and common captivity-related pathology includes mycotic and bacterial infections.

**Materials and Methods:** A female Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) of unknown age from a private circus was submitted for multiple investigations at the Pathological Anatomy Department of the Faculty of Veterinary Medicine of Bucharest, after sudden death. Reported clinical signs included anorexia, depression and progressive weight loss. The diagnostic methods included radiology, necropsy, cytology (MGG stain), microbiology and histopathology (HE, PAS and Giemsa stains).

**Results:** Radiological examination revealed discrete, radiodense areas within the respiratory tract. At necropsy examination, the air sacs were thickened. Multiple yellow, nodular lesions (1–10 mm) were present in the air sacs and lungs and fewer such nodules were found in the liver, spleen and kidneys. Imprint cytopathology revealed necrotic cells and bacteria and fungal hyphae. Microbiological examination isolated *Aeromonas hydrophila* and *Candida krusei*. Histopathology revealed both old and developing multifocal granulomas, with peripheral multinucleated giant cells and cellular reactivity. Fungi were present both inside the granulomas and between lesions. Interstitial nephritis and glomerulosclerosis affected the kidneys. The liver was affected by lymphohistiocytic, subacute inflammation and in the spleen there was histiocytic infiltration and lymphocyte depletion. In addition, protozoan cysts (50–80 µm in diameter) were identified in all major tissues.

**Conclusions:** In Romania, this is the first communication concerning the pathology of a Humboldt penguin that died due to severe respiratory insufficiency. It is a typical example of death caused by synergistic factors (i.e. bacteria, fungi and protozoa) in exotic captive animals.



## CASE REPORT

## Open Access

# Novel adenovirus detected in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) suffering from self-limiting gastroenteritis

Consuelo Rubio-Guerri<sup>1\*</sup>, Daniel García-Párraga<sup>2</sup>, Elvira Nieto-Pelegrín<sup>1</sup>, Mar Melero<sup>1</sup>, Teresa Álvaro<sup>2</sup>, Mónica Valls<sup>2</sup>, Jose Luis Crespo<sup>2</sup> and Jose Manuel Sánchez-Vizcaíno<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Adenoviruses are common pathogens in vertebrates, including humans. In marine mammals, adenovirus has been associated with fatal hepatitis in sea lions. However, only in rare cases have adenoviruses been detected in cetaceans, where no clear correlation was found between presence of the virus and disease status.

**Case presentation:** A novel adenovirus was identified in four captive bottlenose dolphins with self-limiting gastroenteritis. Viral detection and identification were achieved by: PCR-amplification from fecal samples; sequencing of partial adenovirus polymerase (*pol*) and hexon genes; producing the virus in HeLa cells, with PCR and immunofluorescence detection, and with sequencing of the amplified *pol* and *hexon* gene fragments. A causative role of this adenovirus for gastroenteritis was suggested by: 1) we failed to identify other potential etiological agents; 2) the exclusive detection of this novel adenovirus and of seropositivity for canine adenoviruses 1 and 2 in the four sick dolphins, but not in 10 healthy individuals of the same captive population; and 3) the virus disappeared from feces after clinical signs receded. The partial sequences of the amplified fragments of the *pol* and *hexon* genes were closest to those of adenoviruses identified in sea lions with fatal adenoviral hepatitis, and to a Genbank-deposited sequence obtained from a harbour porpoise.

**Conclusion:** These data suggest that adenovirus can cause self-limiting gastroenteritis in dolphins. This adenoviral infection can be detected by serology and by PCR detection in fecal material. Lack of signs of hepatitis in sick dolphins may reflect restricted tissue tropism or virulence of this adenovirus compared to those of the adenovirus identified in sea lions. Gene sequence-based phylogenetic analysis supports a common origin of adenoviruses that affect sea mammals. Our findings suggest the need for vigilance against adenoviruses in captive and wild dolphin populations.

**Keywords:** Adenovirus, Cetacean, Bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*

## Background

Adenoviruses are common pathogens of vertebrates [1] that were first discovered in human adenoids [2], and were soon identified as a cause of canine hepatitis [3]. These icosahedral non-enveloped, double-stranded DNA viruses have genomes that range from 26 to 45 kbp [4], and have been demonstrated in all vertebrate classes [1,5]. Most adenoviral species show quite restricted host specificity and tend to be associated with a typical pathology [5]; for example, human adenovirus (HAdV) C causes respiratory

disease and HAdV-D provokes conjunctivitis, whereas these two pathologies can also be the result of HAdV-B infection. In contrast, HAdV-F and HAdV-G produce gastroenteritis in most cases [1]. Similarly to human adenoviruses, other adenoviruses that affect mammals (forming the *Mastadenovirus* genus) have been reported to cause respiratory, ocular and gastrointestinal pathologies, although some present as hepatitis [3] or encephalitis as the chief manifestations [5].

In addition to their role in pathology, adenoviruses are very important vectors in the gene therapy of genetic disorders and cancer [6], as they can accommodate a large DNA cargo, exhibit tropisms for multiple organs and can be engineered to decrease virulence. Nonetheless, they still

\* Correspondence: consuelo@sanidadanimal.info

<sup>1</sup>VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Av Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Rubio-Guerri et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.





## Two cases of pseudohermaphroditism in loggerhead sea turtles *Caretta caretta*

Jose Luis Crespo<sup>1,2,\*</sup>, Daniel García-Párraga<sup>1</sup>, Ignacio Giménez<sup>3</sup>,  
Consuelo Rubio-Guerri<sup>2</sup>, Mar Melero<sup>2</sup>, José Manuel Sánchez-Vizcaíno<sup>2</sup>,  
Adolfo Marco<sup>5</sup>, Jose A. Cuesta<sup>6</sup>, María Jesús Muñoz<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Veterinary Services, Oceanogràfic, Ciudad de las Artes y las Ciencias, C/ Eduardo Primo Yúfera (Científic), 46013 Valencia, Spain

<sup>2</sup>VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta del Hierro, 28040 Madrid, Spain

<sup>3</sup>Rara Avis Biotec, C/ Moratín 17, 46002 Valencia, Spain

<sup>4</sup>Animal Health Research Center, CISA-INIA, Ctra. de Algete a El Casar s/n, 28130 Valdeolmos, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Estación Biológica de Doñana (CSIC), C. Américo Vespucio s/n, 41092, Sevilla, Spain

<sup>6</sup>Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC), Avda. República Saharaui, 2, 11519 Puerto Real, Cadiz, Spain

**ABSTRACT:** Two juvenile (curved carapace lengths: 28 and 30 cm) loggerhead sea turtles *Caretta caretta* with precocious male external characteristics were admitted to the ARCA del Mar rescue area at the Oceanogràfic Aquarium in Valencia, Spain, in 2009 and 2010. Routine internal laparoscopic examination and subsequent histopathology confirmed the presence of apparently healthy internal female gonads in both animals. Extensive tissue biopsy and hormone induction assays were consistent with female sex. To the best of our knowledge, this is the first report of pseudohermaphroditism in loggerhead sea turtles based on sexual external characteristics and internal laparoscopic examination. Our findings suggest that the practice of using external phenotypical characteristics as the basis for gender identification in sea turtles should be reevaluated. Future research should focus on detecting more animals with sexual defects and their possible effects on the sea turtle population.

**KEY WORDS:** Sex development disorder · Loggerhead turtle · *Caretta caretta* · Reptile · Endocrine disruptor

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

### INTRODUCTION

Early sex identification is a constant challenge in sea turtles given the invasiveness of actual procedures and their importance in sex ratio estimation, which is considered an indispensable tool to evaluate and manage animal populations, especially in wildlife programs. Slight temperature fluctuations can significantly affect the sex ratio of populations of certain species, including sea turtles (Warner & Shine 2011, Patiño-Martínez et al. 2012). Therefore,

this parameter is important for monitoring the dynamics of captive and free-ranging populations (Raynaud & Pieau 1985, Janzen & Paukstis 1991). Sea turtles display temperature-dependent sex determination (TSD; Yntema & Mrosovsky 1982, Standora & Spotila 1985, Crews et al. 1994); their sexual phenotype is determined during the thermosensitive period of egg incubation (Miller & Limpus 1981, 2003, Pieau et al. 1994). Temperature fluctuations affecting the sex ratio can arise due to natural (e.g. beach thermal zones, meteorological

\*Email: jlcrespo@sanidadanimal.info







## REVIEW ARTICLE

# Systematic review of surveillance systems and methods for early detection of exotic, new and re-emerging diseases in animal populations

V. RODRÍGUEZ-PRIETO<sup>1\*†</sup>, M. VICENTE-RUBIANO<sup>1†</sup>, A. SÁNCHEZ-MATAMOROS<sup>1,2</sup>, C. RUBIO-GUERRI<sup>1</sup>, M. MELERO<sup>1</sup>, B. MARTÍNEZ-LÓPEZ<sup>1,3</sup>, M. MARTÍNEZ-AVILÉS<sup>1</sup>, L. HOINVILLE<sup>4</sup>, T. VERGNE<sup>5</sup>, A. COMIN<sup>6</sup>, B. SCHAUER<sup>7</sup>, F. DÓREA<sup>6</sup>, D. U. PFEIFFER<sup>5</sup> AND J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> VISA-VET Centre and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup> CEI Campus Moncloa, UCM-UPM, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Center for Animal Disease Modeling and Surveillance, Department of Medicine and Epidemiology, UC Davis, CA, USA

<sup>4</sup> AHVLA Centre for Epidemiology & Risk Analysis, Animal Health Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, Surrey, UK

<sup>5</sup> RVC Veterinary Epidemiology, Economics and Public Health Group, Royal Veterinary College, North Mymms, London, UK

<sup>6</sup> SVA Department of Disease Control and Epidemiology, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden

<sup>7</sup> FLI Institute of Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institute, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald – Insel Riems, Germany

Received 3 April 2014; Final revision 25 July 2014; Accepted 27 July 2014

## SUMMARY

In this globalized world, the spread of new, exotic and re-emerging diseases has become one of the most important threats to animal production and public health. This systematic review analyses conventional and novel early detection methods applied to surveillance. In all, 125 scientific documents were considered for this study. Exotic ( $n = 49$ ) and re-emerging ( $n = 27$ ) diseases constituted the most frequently represented health threats. In addition, the majority of studies were related to zoonoses ( $n = 66$ ). The approaches found in the review could be divided in surveillance modalities, both active ( $n = 23$ ) and passive ( $n = 5$ ); and tools and methodologies that support surveillance activities ( $n = 57$ ). Combinations of surveillance modalities and tools ( $n = 40$ ) were also found. Risk-based approaches were very common ( $n = 60$ ), especially in the papers describing tools and methodologies ( $n = 50$ ). The main applications, benefits and limitations of each approach were extracted from the papers. This information will be very useful for informing the development of tools to facilitate the design of cost-effective surveillance strategies. Thus, the current literature review provides key information about the advantages, disadvantages, limitations and potential application of methodologies for the early detection of new, exotic and re-emerging diseases.

**Key words:** Animal health, surveillance, early detection, emerging diseases, exotic diseases, systematic review.

\* Author for correspondence: Mr V. Rodríguez-Prieto, VISA-VET Centre and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

† These authors served as joint first authors.  
(Email: victor@sanidadanimal.info)





